

Analyse der funktionellen Diversität der Profilin-Isoformen 1 und 2a

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Kai Thomas Murk
aus Goslar

1. Referentin: Professor Dr. Brigitte M. Jockusch
2. Referent: Professor Dr. Martin Korte
eingereicht am: 15.10.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am: 03.12.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Jockusch, B.M., Murk, K., and Rothkegel, M. (2007). The profile of profilins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 159, 131-149.

Murk, K., Buchmeier, S., Jockusch, B.M. and Rothkegel, M. (2008) In birds, a homologue of neuronal mouse profilin 2a is ubiquitously expressed and contributes substantially to actin-based motility. *Journal of Cell Science*. im Druck

Tagungsbeiträge

Murk, K., Michaelsen, K., Jockusch, W., Korte, M. and Rothkegel M.: Localisation of endogenous profilin 2a in murine primary neurons and bipolar cells. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Braunschweig (2006). *Eur. J. Cell Biol. Suppl.* 56, Abstract MS2-2.

Buchmeier, S., Murk, K., Geisler, T.; Jockusch, B.M. and Rothkegel, M.: New monoclonal antibodies for isoform specific recognition of neuronal profilin 2a. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Braunschweig (2006). *Eur. J. Cell Biol. Suppl.* 56, Abstract MS2-1.

Murk, K., Buchmeier, S., Korte, M., Jockusch, B.M. and Rothkegel, M. (2008) In birds, a homologue of neuronal mouse profilin 2a is ubiquitously expressed and contributes substantially to actin-based motility. (Poster) CMPB-Symposium "From Neurogenesis to Synaptogenesis", Göttingen (2008).

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XIII
Zusammenfassung	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Struktur und biochemische Eigenschaften des Mikrofilamentsystems	1
1.1.2 Funktionen des Aktin-Cytoskeletts in der Neuritogenese	2
1.3 Das Aktin-Cytoskelett in Synapsen	4
1.3.1 Die Organisation des Aktin-Cytoskeletts in der Präsynapse	4
1.3.2 Das Aktin-Cytoskelett in excitatorischen Postsynapsen	5
1.3.3 Das Aktin-Cytoskelett in der inhibitorischen Postsynapse	7
1.4 Profilin	9
1.4.1 Die Struktur von Profilin	9
1.4.2 Liganden von Profilin	10
1.4.3 Cytoplasmatische Funktionen von Profilin	13
1.4.3 Funktionen von Profilin im Zellkern	15
1.4.4 Profilin-Isoformen in Mammalia	15
1.4.5 Bekannte Funktionen der Profilin-Isoformen 1 und 2a im zentralen Nervensystem	16
1.5 Aufgabenstellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Chemikalien und Enzyme	20
2.1.3 Bakterienstämme	20
2.1.4 Eukaryontische Zellen	20
2.1.5 Vektoren	21
2.1.6 Oligodesoxynucleotide	22
2.1.7 Antikörper	25

2.2	Mikrobiologische Methoden	26
2.2.1	Kultivierung von Bakterien	26
2.3	Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i>	27
2.3.2	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	27
2.3.3.	Minipräparation von Plasmid-DNA durch Alkalische Lyse	27
2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	27
2.3.5	DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonucleasen	28
2.3.6	DNA-Gelelektrophorese	28
2.3.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	28
2.3.8	Hybridisierung von Oligonukleotiden	29
2.3.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten per Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP)	29
2.3.10	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels T4-Polynukleotid-Kinase	29
2.3.11	DNA-Ligation	29
2.3.12	Ortsgerichtete Mutagenese	30
2.3.13	DNA-Sequenzierung	30
2.4	Biochemische Methoden	
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	31
2.4.2	Proteinbestimmung über das Lambert Beersche Gesetz	31
2.4.3	Konzentrieren von Proteinen	31
2.4.4	Umpuffern von Proteinen	32
2.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.4.6	Western Blot	34
2.4.7	Denaturierende Proteinpräzipitation mittels Trichloressigsäure	
2.4.8	Expression und Reinigung von rekombinantem Profilin 2a per Poly-Prolin-Affinitätschromatographie	34
2.4.9	Reinigung von genuinem Profilin 1 und 2a	35
2.4.10	Reinigung von Profilin 2 mittels IMPACT-CN-System (NEB)	36
2.4.11	Analyse der Poly-Prolin-Bindung von Profilin 2a durch Präzipitation per Poly-Prolin-Sepharose	37
2.4.12	Quantitative Analyse der Poly-Prolin-Bindung von Profilin 2a durch spektral fluorimetrische Messung der Tryptophan-Fluoreszenz	38
2.4.13	Quantitative Analyse der G-Aktin-Bindung von Profilin 2a durch „non-steady“ Aktin-Polymerisation mit Pyren-Aktin	38
2.4.14	Herstellung von Zell- und Gewebe-Extrakten	39
2.4.15	Affinitätschromatographie von Profilin-Liganden per Intein-Profilin 2a	39
2.4.16	Dephosphorylierung von Proteinen mittels „calf intestine phosphatase (CIP)“	40

2.4.17	2D-Gel-Elektrophorese von Proteinen	40
2.4.18	Kopplung von Proteinen an NHS-aktivierte Sepharose	41
2.4.19	Elisa	41
2.4.20	Epitop-Kartierung von monoklonalen Antikörpern	42
2.5	Zellbiologische Methoden	43
2.5.1	Kultivierung und Passagieren von adhärenenten Zelllinien	43
2.5.2	Transfektion von Zelllinien mittels FuGENE6 (Roche)	43
2.5.3	Transfektion tierischer Zellen mittels TransIT-LT1 (Mirus)	44
2.5.4	Collagenisieren von Kulturschalen	44
2.5.5	Präparation und Kultivierung von primären Hühnerfibroblasten	44
2.5.6	Quantifizierung des Profilin-Gehalts von Zell- und Gewebeextrakten per Chemolumineszenz	45
2.5.7	Paraformaldehyd-Fixierung und Permeabilisierung adhärenenter Zellen	45
2.5.8	Fluoreszenzfärbung eukaryontischer Zellen	46
2.5.9	Fluoreszenzfärbung eukaryontischer Zellen per Zenon-Technologie	46
2.5.10	Konfokale Laser scanning Mikroskopie	47
2.5.11	Untersuchung des Anheftungs- und Ausbreitungsverhaltens von Zellen	48
2.5.12	Chemotaxis-Analyse von Zellen durch Filtereinsätze	48
2.5.13	Stimulation kultivierter Neurone mit N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Generierung Profilin-Isoform spezifischer Antikörper	50
3.1.1	Affinitätsreinigung des anti-Profilin 2a-Serums # 361	50
3.1.2	Charakterisierung des monoklonalen anti-Profilin 2a Antikörpers 4H5	51
3.1.3	Charakterisierung des monoklonalen Profilin 1 Antikörpers 2C5	54
3.2	Lokalisation von Profilin 1 und Profilin 2a in neuronalen Zellen	56
3.2.1	Doppelfärbung monoklonaler Antikörper per Zenon-Technologie	56
3.2.2	Lokalisation der Profilin-Isoformen 1 und 2a in Synapsen	58
3.2.3	Co-Lokalisation von Profilin 1 und 2a mit Gephyrin	60
3.2.4	Lokalisation von Profilin 1 und 2a in „dendritic spines“	62
3.2.5	Lokalisation von Profilin 1 und 2a in Nuclei hippocampaler Neurone	64
3.2.6	Expression und Lokalisation von Profilin 1 und 2a in Gliazellen	66
3.3	Analyse der funktionellen Diversität von Profilin 1 und 2a mittels eines „Knock down & Knock in“-Vektor-Systems	70
3.3.1	Plasmid gestützte RNA-Interferenz von Profilin 1 und 2a	70
3.3.2	Identifikation funktioneller shRNA-Sequenzen zum Isoform-spezifischen Knock down von Profilin 1 und 2a	71
3.3.3	Konstruktion von „Knock down & Knock in“-Vektoren	75

Inhaltsverzeichnis		IV
3.3.4	Generierung von Profilin 2a-Mutanten	79
3.3.5	Präparation von Profilin 2a durch Poly-Prolin-Affinitätschromatographie	81
3.3.6	Präparation der Poly-Prolin-Bindungsmutante mPFN2a Y29,133S über das Impact-CN-Expressionssystem	81
3.3.7	Biochemische Charakterisierung der Profilin 2a-Bindungsmutanten	83
3.3.7.1	Analyse der Affinität von mPFN2a Y29,133S zu Poly-Prolin	83
3.3.7.2	Einfluss der Profilin 2a-Mutanten auf die Aktin-Polymerisation	85
3.3.8	Einsatz des Profilin 2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Systems in organotypischen Neuronen	86
3.3.9	Isolierung endogener Profilin-2a-Liganden per Intein-Affinitätschromatographie	91
3.4	Analyse von Profilin 1 und 2a in nicht-neuronalen Zellen	93
3.4.1	Konservierung der Profilin-Isoformen 1 und 2a in Vertebraten	93
3.4.2	Identifikation von Profilin 1 und 2a in Hühnerfibroblasten	95
3.4.3	Bestimmung der Expressionsmuster von Profilin 1 und 2a in pränatalen und adulten Geweben des Huhns	96
3.4.4	Lokalisation und Expression der Profilin-Isoformen 1 und 2a in Hühnerfibroblasten	98
3.4.5	Isoform-spezifische Phosphorylierung von Profilin 2a in Hühnerfibroblasten	101
3.4.6	RNA-Interferenz der Profilin-Isoformen 1 und 2a in Hühnerfibroblasten	103
3.4.7	Untersuchung der Funktionen von Profilin 1 und Profilin 2a in Aktin-abhängigen Prozessen kultivierter Hühnerfibroblasten	106
3.4.8	Analyse des Matrix-Kontaktes Profilin-defizienter Fibroblasten	106
3.4.9	Analyse der Anheftungsstrukturen Profilin-defizienter Hühnerfibroblasten	108
3.4.10	Analyse der gerichteten Bewegung von Profilin-defizienten Hühnerfibroblasten	110
4	Diskussion	112
4.1	Profilin 1 und Profilin 2a in Neuronen	113
4.1.1	Profilin 2a akkumuliert in inhibitorischen Postsynapsen	113
4.1.2	Lokalisation von Profilin 1 und 2a in „dendritic spines“	115
4.1.3	Funktionen von Profilin 2a in excitatorischen Postsynapsen	117
4.1.4	Regulation der dendritischen Morphologie durch die Interaktion von Profilin 2a mit G-Aktin und Poly-Prolin-Liganden	120
4.1.5	Profilin als möglicher Effektor von neuronalen Signalkaskaden?	122
4.1.6	Kernlokalisierung von Profilin 1 und 2a in Neuronen	126

4.2	Profilin in Gliazellen	128
4.3	Funktionen von Profilin 2a in Aktin-abhängigen Prozessen nicht-neuronaler Zellen	131
4.4	Ausblick	133
4.4.1	Ausblick zur Analyse von Profilin 1 und Profilin 2a in Neuronen	134
4.4.2	Ausblick zur Erforschung von Profilin 1 und 2a in Gliazellen	134
4.4.3	Ausblick zur Untersuchung von Profilin 1 und 2a in anderen Organismen	135
4.4.4	Mögliche Modifikationen des „Knock down & Knock in“-Vektorsystems	135

5 Literaturverzeichnis

Anhang

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2-Azinobis-3-Ethylbenzthiazolin-Sulfon-Säure
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoazolpropionat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-ptoluidinsalz
Bp	engl. Basenpaare
BiPro	Birkenprofilin
BSA	engl. Rinderserumalbumin
CEE	engl. Hühnerembryo-Extrakt
CFP	„cyan fluorescent protein“
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CIP	„calf intestine phosphatase“
cDNA	„copy Desoxynucleinsäure“
CMV	Cytomegalie-Virus
C -Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIV	„day of <i>in vitro</i> differentiation“
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRET	„fluorescence energy transfer“
GABA	engl. Gamma-Aminobuttersäure
G-Aktin	globuläres Aktin

GFAP	„glial fibrillar acidic protein“
GFP	„green fluorescent protein“
GFP-F	„farnysilated green fluorescent protein“
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(Ethanschwefelsäure)
hnRNP	„heterogenous nuclear ribonucleoprotein“
HRP	engl. Meerettichperoxidase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LTD	„long term depression“
LTP	„long term potentation“
MALDI-TOF	„matrix ...
mDia	„mammalian diaphanous“
mHSP70	„mitochondrial heat shock protein 70“
miRNA	„micro RNA“
MWCO	„molecular weight cut off“
NBT	Nitroblau-Tetrazodiumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nt	Nukleotid
N - Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PCR	engl. Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PFN	Profilin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PNC	„perinucleolar compartments“
PSD	„postsynaptic density“
Psi	engl. pressure per square inch
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RISC	„RNA induced silencing complex“
rpm	engl. Umdrehung pro Minute

RRP	„readily releasable pool“
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	engl. Natriumdodecylsulfat
SDS-PAA-Gel	SDS-Polyacrylamid-Gel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	„short hairpin RNA“
siRNA	„short interfering RNA“
SMN	„survival motoneuron-protein“
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat-Lösung
U	Unit – engl. Enzymeinheiten
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
VASP	„vasodilator-stimulated phosphoprotein“
VGAT	„vesicular GABA transporter“
v/v	Volumen / Volumen
v/w	Volumen / Masse
N-WASP	neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE	WASP-family verprolin-homologous protein
w/v	Masse/Volumen
well	engl. Vertiefung
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YFP	„yellow fluorescent protein“
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Struktur eines Aktin-Monomers	1
Abb. 1.2:	Darstellung der Aktin-Dynamik	2
Abb. 1.3	Aktin-Organisation im Wachstumskegel	3
Abb. 1.4	Die Beteiligung des Mikrofilamentsystems an Prozessen des präsynaptischen Vesikelzyklus	5
Abb. 1.5:	Morphologie der „dendritic spines“	6
Abb. 1.6	Schematische Darstellung der PSD exzitatorischer Postsynapsen	7
Abb. 1.7:	Aufbau der PSD inhibitorischer Postsynapsen mit Glycin-Rezeptoren	8
Abb. 1.8:	Struktur des Rinderprofilin 1 mit den Bindungsregionen für G-Aktin (rot), Phospholipide (grün) und Poly-Prolin-Liganden (blau)	10
Abb. 1.9:	Struktur des Komplexes aus Rinderprofilin 1 (gelb) und G-Aktin (blau)	11
Abb. 1.10:	Struktur von Rinderprofilin 1 (gelb) komplexiert mit einem Poly-Prolin-Peptid (rot)	12
Abb. 1.11:	Darstellung ausgewählter Aktin-abhängiger Prozesse an der Plasmamembran unter Beteiligung von Profilin	14
Abb. 2.1:	Schematische Illustration des Funktionsprinzips des IMPACT-CN-Systems	36
Abb. 2.2:	Funktionsprinzip der Zenon-Technologie	47
Abb. 3.1:	Spezifität des Antiserums #361 nach Affinitätsreinigung mit Profilin 1	51
Abb. 3.2:	Spezifität des monoklonalen anti-Profilin 2a-Antikörpers 4H5	52
Abb. 3.3:	Epitopkartierung des anti-PFN2a Antikörpers 4H5	53
Abb. 3.4:	Nachweis der Spezifität des anti-PFN2 Antikörpers 4H5 in Profilin 2a exprimierenden Zellen	53
Abb. 3.5:	Struktureller Aufbau der polyhedralen Nanopartikel	54
Abb. 3.6:	Darstellung der Spezifität des Antikörpers 2C5	55
Abb. 3.7:	Fluoreszenzfärbung von endogenem Profilin 1 durch den Antikörper 2C5 in C2C12-Myoblasten	55
Abb. 3.8:	Doppelfärbung von Raver1 und mHSP70 in C2C12-Myoblasten mittels monoklonaler Antikörper	57
Abb. 3.9:	Darstellung von Profilin 1 und 2a in Synapsen	59

Abb. 3.10:	Co-Lokalisation von Profilin 2a mit synaptischen Gephyrin-Clustern	61
Abb. 3.11:	Differenzielle Lokalisation von Profilin 1 und 2a in Neuriten	62
Abb. 3.12:	Differenzielle Lokalisation von Profilin 1 und Profilin 2a in „dendritic spines“	63
Abb. 3.13:	Differenzielle Lokalisation von Profilin 1 und 2a in Nuclei von Neuronen	65
Abb. 3.14:	Profilin 2a lokalisiert in Nuclei von Ependym-Zellen	67
Abb. 3.15:	Darstellung von Profilin 1 und 2a in Astrocyten	68
Abb. 3.16:	Profilin-Lokalisation in hippocampalen Oligodendrocyten	69
Abb. 3.17:	Schema des Vektors pRNAT-U6.3/Hygro	71
Abb. 3.18:	Western Blot-Analyse von HeLa-Zellen nach Co-Transfektion mit dem PFN1-spezifischen RNAi-Vektor pRNAT 1.3 und Profilin-Expressionsvektoren	73
Abb. 3.19:	Nachweis der RNA-Interferenz von endogenem Profilin 1 durch den RNAi-Vektor pRNAT 1.3	73
Abb. 3.20:	Western Blot-Analyse von HeLa-Zellen nach Co-Transfektion mit PFN2a-spezifischen RNAi-Vektor und PFN2a-Expressionsvektoren	74
Abb. 3.21:	Knock down des endogenen Profilin 2a in Neuronen nach Transfektion mit pRNAT 2.13	75
Abb. 3.22:	Funktionalität eines Profilin 1-spezifischen „Knock down & Knock in“ in HeLa-Zellen	76
Abb. 3.23:	Profilin 2a-spezifische „Knock down & Knock in“-Vektoren der zweiten Generation	78
Abb. 3.24:	Darstellung von Schlüsselpositionen der G-Aktin-Bindungsdomäne von Profilin 1 und 2a	79
Abb. 3.25:	Struktureller Vergleich der Poly-Prolin-Bindungsdomänen von Profilin 1 und Profilin 2a	80
Abb. 3.26:	SDS-PAGE-Analyse einzelner Fraktionen einer Profilin 2a-Präparation	81
Abb. 3.27:	Reinigung der Poly-Prolin-Bindungsmutante mPFN2a Y29,133S über das Impact-CN-System	82
Abb. 3.28:	Pull down-Experiment von mPFN2a WT und mPFN2a Y29,133S mit Poly-Prolin-Sepharose	83
Abb. 3.29:	Spektralfluorimetrische Messung der Poly-Prolin-Bindung von mPFN2a und mPFN2a Y29,133S	84
Abb. 3.30:	Effekt von Wildtyp-Profilin 2a und Profilin 2a-Mutanten auf die Aktin-Polymerisation	85
Abb. 3.31:	Darstellung organotypisch kultivierter CA1-Neurone nach Transfektion mit dem Profilin 2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Vektorsystem und pEGFP-F	87

Abb. 3.32:	Sholl-Analysen apikaler Dendriten nach Transfektion mit Profilin 2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Vektoren	88
Abb. 3.33:	Sholl-Analysen basaler Dendriten nach Transfektion mit Profilin 2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Vektoren	89
Abb. 3.34:	Quantifizierung der „dendritic spine“-Dichte in organotypischen CA1-Neuronen nach Transfektion mit Profilin 2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Vektoren	90
Abb. 3.35:	Immunchemischer Nachweis von Profilin 2a-Liganden nach Affinitätschromatographie mit Intein-Profilin 2a	92
Abb. 3.36:	Immunchemische Analyse von Vinculin und Tubulin nach Affinitätschromatographie mit Intein-Profilin 2a	92
Abb. 3.37:	Sequenzvergleiche der Profilin-Isoformen 1 und 2a aus Maus und Huhn	94
Abb. 3.38:	Nachweis von chPFN1 und chPFN2a durch Profilin-Isoform-spezifische Antikörper	95
Abb. 3.39:	Expressionsmuster der Profile 1 und 2a in Organen des adulten Huhns	97
Abb. 3.40:	Expressionsmuster der Profile 1 und 2a in pränatalen Organen des Huhns	98
Abb. 3.41:	Differenzielle Lokalisation von Profilin 1 und 2a in Hühnerfibroblasten	99
Abb. 3.42:	Analyse der kultivierungsabhängigen Expression von Profilin 1 und 2a in Hühnerfibroblasten	99
Abb. 3.43:	Serum-abhängige Lokalisationsänderung von Profilin 1 in Hühnerfibroblasten	100
Abb. 3.44:	Quantifizierung der Serum-abhängigen Lokalisationsänderung von Profilin 1 in kultivierten Hühnerfibroblasten	101
Abb. 3.45:	Analyse der <i>in vivo</i> -Phosphorylierung von Profilin in Hühnerfibroblasten	102
Abb. 3.46:	Darstellung des miRNA-Vektors pcDNA6.2-EmGFP-miR	103
Abb. 3.47:	Profilin-Isoform-spezifischer Knock down von Profilin 1 und Profilin 2a in Hühnerfibroblasten	105
Abb. 3.48:	Anheftungsverhalten von Hühnerfibroblasten nach Knock down von PFN1 und/oder PFN2a	107
Abb. 3.49:	Analyse der Fokalkontakte Profilin-defizienter Hühnerfibroblasten	109
Abb. 3.50:	Analyse der chemotaktischen Bewegung von Profilin-defizienten Hühnerfibroblasten	111
Abb. 4.1:	Hypothese zur Aktivierung von Profilin 2a durch Trk-Rezeptoren	123
Abb. 4.2:	Hypothetisches Modell zur Regulation von Profilin 2a durch den p75-Neurotrophin-Rezeptor	124
Abb. 4.3:	Modell zur Glutamat-Rezeptor-RhoA-abhängigen Regulation von PFN2a und Cofilin/ADF	126

Abb. 4.4:	Sequenzvergleich der Aktin-Bindungsregion von Profilin 1-Isoformen aus verschiedenen Organismen	132
-----------	---	-----

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Poly-Prolin-Liganden von Profilin	12
Tab. 2.1:	Liste der verwendeten Sequenzierungsprimer	22
Tab. 2.2	Liste der Oligonukleotide für die RNA-Interferenz von Profilin 1 und 2a	23
Tab. 2.3:	Liste der Primer zur Mutagenese von Profilin 2a	24
Tab. 2.4:	Primer zur Genierung zusätzlicher Schnittstellen in Plasmiden	24
Tab. 2.5:	Übersicht der eingesetzten primären Antikörper	25
Tab. 2.6:	Übersicht der eingesetzten Sekundär-Antikörper und Reagenzien	26
Tab. 2.7:	prestained protein weight marker, NEB	32
Tab. 2.8:	Low molecular weight protein marker, Sigma	33
Tab. 2.9:	Spezifikationen zur konfokalen Mikroskopie verschiedener Fluorochrome	48
Tab. 3.1:	Zusammenfassung der Analysen von Profilin 1 und Profilin 2a in Gliazellen	69
Tab. 3.2:	Liste der generierten Profilin-Mutanten	80
Tab. 3.3:	Quantifizierung des zum Zeitpunkt T $\frac{1}{2}$ gebildeten F-Aktin	86
Tab. 3.4:	Konservierung der Profilin-Isoformen 1 und 2a innerhalb der Chordata	93
Tab. 3.5:	Quantifizierung von chPFN1 und chPFN2a in adulten Organen	97
Tab. 3.6:	Quantifizierung von chPFN1 und chPFN2a in pränatalen Organen (E15)	98
Tab. 3.7:	Expression von Profilin in Hühnerfibroblasten	99

Zusammenfassung

Profiline sind kleine Aktin-bindende Proteine, die bisher in allen untersuchten Eukaryonten identifiziert werden konnten. In der Regulation der Aktin-Dynamik übernehmen diese Proteine eine zentrale Funktion, in dem sie den Nukleotidaustausch der Aktin-Monomere beschleunigen. Außerdem fördern Profiline die Aktin-Polymerisation, in dem sie Aktin-Monomere an die schnell-wachsenden Enden bestehender Aktin-Filamente befördern. Da diese Funktionen des Profilins ganz allgemein für die Modulation der Aktin-Dynamik aller eukaryontischer Zellen essentiell sind, ist die Existenz Gewebs- und Spezies-spezifischer Profilin-Isoformen bisher weitgehend unverstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich das in Mammalia ubiquitär exprimierte Profilin 1 und das ZNS-spezifische Profilin 2a redundant zueinander verhalten oder ob sie unterschiedliche Funktionen besitzen. Obwohl beide Proteine *in vitro* über ähnliche biochemische Eigenschaften verfügen, konnte durch die Verwendung Profilin-Isoform-spezifischer Antikörper eine unterschiedliche Lokalisation von Profilin 1 und Profilin 2a in kultivierten Neuronen nachgewiesen werden. Während Profilin 1 überwiegend homogen in den Neuriten verteilt ist, akkumuliert Profilin 2a in synaptischen Strukturen. Neben dem spezifischen Nachweis beider Profilin-Isoformen in Neuronen konnte erstmals die Expression dieser Profiline in verschiedenen Gliazelltypen des Rattenhirns gezeigt werden.

Für *in vivo*-Analysen wurde in dieser Arbeit ein RNAi-System entwickelt, mit dem direkt in Zellen endogene Proteine gegen exogene Varianten substituiert werden können. Durch dieses sogenannte „Knock down & Knock in“-System konnte der Einfluss von Profilin 2a-Bindungsmutanten in organotypisch kultivierten Neuronen aus postnatalen Hippocampi der Maus untersucht werden. Der Verlust von Profilin 2a führt zu einer verringerten Anzahl von dendritischen Verzweigungen sowie von „dendritic spines“ in CA1-Neuronen. Durch die Substitution des endogenen Profilin 2a mit einer Profilin-Mutante mit reduzierter Aktin-Bindung wurde gezeigt, dass die Modulation der dendritischen Morphologie auf der direkten Interaktion von Profilin 2a mit Aktin beruht. Hingegen bewirkt die Expression einer Poly-Prolin-Bindungsmutante von Profilin 2a nicht nur eine Wiederherstellung der normalen dendritischen Komplexität der CA1-Neurone nach knock-down des Wildtyp-Profilin 2a, sondern führt darüber hinaus zu einer signifikanten Erhöhung der Dichte von „dendritic spines“ in spezifischen Bereichen der CA1-Neurone. Diese Resultate deuten auf eine Aktin-regulierende Funktion von Profilin 2a in excitatorischen Postsynapsen.

Sequenzvergleiche ergaben, dass Profilin 2a zwischen verschiedenen Vertebraten weit höher konserviert ist als das in Mammalia ubiquitär exprimierte Profilin 1. Expressionsanalysen von Profilin 1 und Profilin 2a in verschiedenen Geweben belegten, dass Profilin 2a im Huhn nicht auf das zentrale Nervensystem beschränkt ist, sondern ubiquitär exprimiert wird. Durch RNAi-Experimente wurde gezeigt, dass in primären Hühnerfibroblasten vornehmlich Profilin 2a anstelle von Profilin 1 für die Modulation der Zelladhäsion und Zellmotilität verantwortlich ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen mit der „Knock-down & Knock-in“ Methodik, dass Profilin 2a neuro-spezifische Funktionen ausübt, die sich auf die Architektur und Morphologie von Synapsen auswirken. Andererseits weisen die Befunde an Hühnerzellen daraufhin, dass Profilin 2a, wie Profilin 1, prinzipiell als Regulator der Aktin-Dynamik fungieren kann.

1 Einleitung

Eukaryontische Zellen haben innerhalb eines Organismus verschiedenste Aufgaben zu erfüllen: In Abhängigkeit intrinsischer und extra-zellulärer Signale müssen sie wachsen, sich teilen, bewegen, ihre Gestalt adaptieren, Stoffe aufnehmen oder abgeben. An vielen biologischen Prozessen in eukaryontischen Zellen ist das Mikrofilamentsystem beteiligt, das einen hochdynamischen Bestandteil des eukaryontischen Cytoskeletts darstellt. Eine zentrale Rolle haben Mikrofilamente während der Morphogenese inne, da durch deren individuelle Organisation die extrem hohe Vielfalt tierischer Zellen entsteht. Deren Erscheinungsformen reichen von eher apolaren Zellen wie z.B. B-Lymphocyten bis hin zu Neuronen, von denen einzelne Zellen über vielfältige Verzweigungen mit Tausenden anderer Zellen in Kontakt stehen können. Über die Morphologie einzelner Zellen hinaus vermittelt das Mikrofilamentsystem die koordinierte Bewegung tierischer Zellen sowie die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, die z.B. für die Gewebebildung von fundamentaler Bedeutung sind. Auch in ausdifferenzierten Geweben übernimmt das Mikrofilamentsystem vielfältige Funktionen. Speziell wird dies anhand des im ständigen Wandel begriffenen zentralen Nervensystems deutlich, in dem dieses Proteinnetzwerk die strukturellen Voraussetzungen für Lern- und Gedächtnisprozesse schafft.

1.1 Struktur und biochemische Eigenschaften des Mikrofilamentsystems

Mikrofilamente bestehen aus dem hochkonservierten Strukturprotein Aktin, das bisher in allen untersuchten Eukaryonten identifiziert werden konnte (Schleicher & Jockusch, 2008). Neben der polymerisierten Form, F-Aktin, kann Aktin in Abhängigkeit äußerer Bedingungen als globuläres Monomer, G-Aktin, vorliegen. Das 42 kDa große G-Aktin-Molekül besitzt zwei Hauptdomänen, die durch eine Furche getrennt sind. In dieser Furche liegen entweder ADP oder ATP sowie zweiwertige Kationen wie Calcium - oder Magnesium-Ionen gebunden vor (Kabsch et al., 1990).

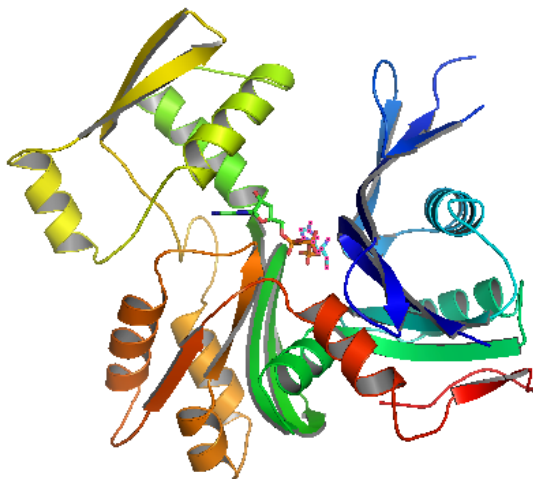


Abb. 1.1: Struktur eines Aktin-Monomers

Röntgen-Kristallstruktur von G-Aktin. Die einzelnen Subdomänen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. In der Furche des G-Aktins liegen ATP und ein Calcium-Ion komplexiert vor (Kabsch et al., 1990). Das Strukturmodell wurde mit Hilfe des Programms PyMol erstellt.

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde der prinzipielle Mechanismus der Aktin-Polymerisation *in vitro* untersucht. Unter geeigneten Bedingungen bezüglich der Ionen-Konzentration, dem pH-Wert und einer ausreichenden Menge an ATP erfolgt zu Beginn der langsamste und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Polymerisation: die Bildung von Nukleationskeimen aus Aktin-Trimeren (Cooper et al., 1983). Anschließend kommt es in schneller Folge zur Anlagerung von Aktin-Monomeren und damit zur Bildung von helikalen Filamenten. Bedingt durch die Polarität der Aktin-Untereinheiten verfügen Aktin-Filamente über ein Minus- und ein Plus-Ende, an die sich die Aktin-Monomere mit unterschiedlicher Affinität anlagern (Pollard, 1986). Nach der Inkorporation in Filamente erfolgt an den Aktin-Molekülen die Hydrolyse von ATP. Diese Reaktion führt zu einer Konformationsänderung der Aktin-Untereinheiten, die die Depolymerisation der Filamente vom Minus-Ende her begünstigt (Abb. 1.2, Fujiwara et al., 2002, Kuhn & Pollard, 2005).

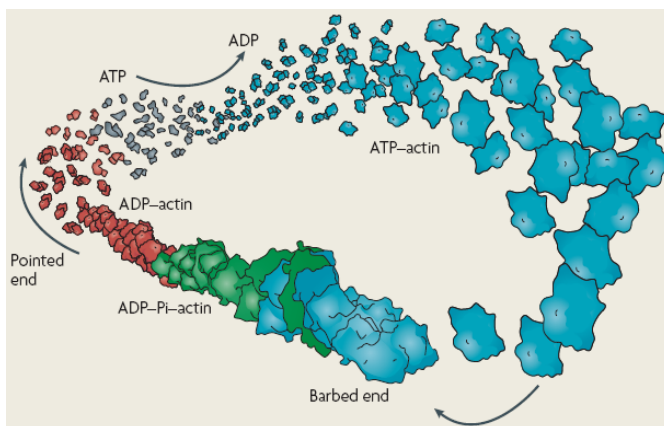


Abb. 1.2: Darstellung der Aktin-Dynamik

ATP-gebundenes G-Aktin bindet bevorzugt an das Plus-Ende (barbed end) der Aktin-Filamente. ATP wird im Aktin-Filament hydrolysiert. Die Depolymerisation des ADP-gebundenen G-Aktins erfolgt am Minus-Ende (pointed end) der Aktin-Filamente. Nach der Depolymerisation wird an freiem G-Aktin ADP zu ATP ausgetauscht (übernommen aus Pak et al., 2008).

Diese Abläufe wurden unter *in vitro* variierbaren Parametern ermittelt. Bei den im Cytosol eukaryontischer Zellen vorherrschenden Bedingungen würde Aktin ohne Regulationsmechanismen überwiegend zu Filamenten polymerisiert vorliegen. Daher werden der Grad der Aktin-Polymerisation und die Organisation der Filamente zu Suprastrukturen durch eine Vielzahl Aktin-assoziiierter Proteine bestimmt. Da sich der wesentliche Teil dieser Arbeit mit der Funktion des Aktin-Regulators Profilin im zentralen Nervensystem beschäftigt, wird daher zunächst detailliert auf die Funktionen des Aktin-Cytoskeletts in neuronalen Zellen eingegangen.

1.2 Funktionen des Aktin-Cytoskeletts in der Neuritogenese

Unter all den verschiedenen Zelltypen im tierischen Organismus besitzen Neurone die wahrscheinlich komplexeste Morphologie. Zu Beginn ihrer Differenzierung liegen Neurone jedoch als apolare Zellen vor, die nach und nach zwei Formen von neuronalen Ausläufern, Axone und Dendriten, ausbilden (Dotti et al., 1988). In Abhängigkeit des Neuron-Subtypus verfügen Axone und Dendriten über eine charakteristische Morphologie: Axone legen meist weite Strecken zurück, führen oft mehrfach Richtungswechsel durch und verzweigen sich schließlich an ihren Enden.

Dagegen erreichen Dendriten meist nicht die Längen von Axonen. Stattdessen bilden sie komplexe Verzweigungen aus, die je nach Neuron-Subtyp eine spezifische Anordnung besitzen und sich bei Lern- und Gedächtnisvorgängen in Form und Größe verändern können (Maletic-Savatic et al., 1999; Sorensen & Rubel, 2006; Spruston, 2008). An den Enden dieser Neuriten befinden sich die Wachstumskegel, die fingerartige Filopodien und breitgefächerte Lamellipodien ausbilden. Ähnlich wie nichtneuronale Zellen bewegen sich die Wachstumskegel der Axone und Dendriten mit diesen Strukturen kriechend fort (Abb. 1.3).

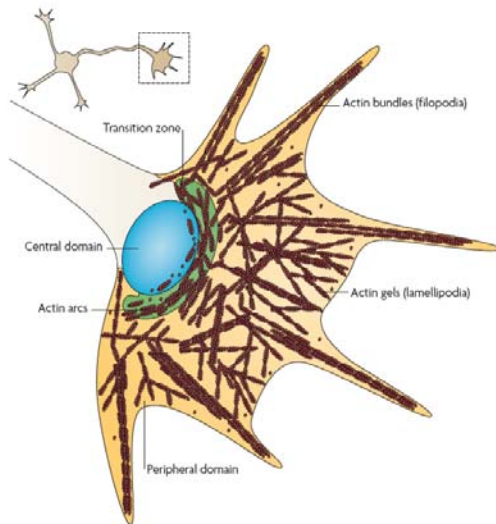


Abb. 1.3 Aktin-Organisation im Wachstumskegel

Die Wachstumskegel neuronaler Zellen verfügen in ihrer Peripherie über Filopodien und Lamellipodien. Filopodien enthalten Aktin-Bündel, während in Lamellipodien Aktin-Filamente netzartig angeordnet sind (übernommen aus Pak et al., 2008).

Die Wanderung der Neuriten ist maßgeblich von der Organisation und Dynamik des Aktin-Cytoskeletts abhängig. Zur Fortbewegung der Wachstumskegel werden in vorderster Front der Wachstumskegel durch Aktin-Polymerisation Lamellipodien und Filopodien neu gebildet bzw. erweitert. Dem gegenüber stehen die gezielte Depolymerisation von Aktin-Filamenten sowie über Myosin-Motorproteine retrograd wirkende Zugkräfte, durch die Lamellipodia und Filopodia zurückgebildet oder zurückgezogen werden können (Zhou & Cohan, 2001; Ahmad et al., 2000; Gallo et al., 2002). Für die gerichtete Bewegung der Neuriten werden diese Mechanismen derart ausbalanciert, dass in Bewegungsrichtung die Aktin-Polymerisation überwiegt. Währenddessen findet in anderen Regionen ein Ausgleich der gegensätzlichen Kräfte statt. Entsprechend bewirkt die selektive Behandlung kleiner Areale von Wachstumskegeln mit F-Aktin-destabilisierenden Cytotoxinen einen Richtungswechsel wachsender Axone (Fan & Raper, 1995). Neuriten führen somit in Abhängigkeit extra-zellulärer und intrinsischer Signale durch asymmetrische Bildung und Destabilisierung von Lamellipodien und Filopodien Richtungswechsel durch (Dent & Gertler, 2003). Zusätzlich kann eine entsprechende Verteilung positiv und negativ auf das Mikrofilamentsystem einwirkender Signale auch die Verzweigung eines Wachstumskegels auslösen (Zhou & Cohan, 2001). Am Ende der Neuritogenese werden die Wachstumskegel von Axonen in synaptische Strukturen umgewandelt, was mit einer distalen Akkumulation von Aktin verbunden ist (Zhang & Benson, 2001).

1.3 Das Aktin-Cytoskelett in Synapsen

Neben der Bildung von Axonen und Dendriten ist das Aktin-Cytoskelett in Neuronen eine treibende Kraft bei der Entstehung, Erhaltung und Modifikation chemischer Synapsen. Im Folgenden werden daher die Organisationsformen und Funktionen des Aktin-Cytoskeletts in reifen Synapsen erläutert.

1.3.1 Die Organisation des Aktin-Cytoskeletts in der Präsynapse

Die Präsynapse stellt das Subkompartiment der Axone dar, von dem aus Neurotransmitter per Exocytose von Vesikeln in den synaptischen Spalt ausgeschüttet werden. Diese synaptischen Vesikel durchlaufen in der Präsynapse einen Zyklus: Zunächst werden in Reserve gehaltene Vesikel aus dem Zentrum der Präsynapse zur so genannten Aktiven Zone, die unmittelbar an der Plasmamembran zum synaptischen Spalt gelegen ist, geleitet. In der Aktiven Zone findet vorübergehend eine Verankerung der Neurotransmitter enthaltenden Vesikel, das „vesicle docking“, statt. Anschließend werden die Vesikel für die Ausschüttung vorbereitet, in dem sie in einem ATP-abhängigen Schritt, dem „vesicle priming“, mit SNARE-Proteinen assoziiert werden. Diese Vesikel stehen nach der Ausbildung der SNARE-Proteinkomplexe zur Exocytose bereit und bilden den „readily releasable pool (RRP)“. Nach Eingang von Aktionspotenzialen löst einströmendes Calcium die Fusion der RRP-Vesikel mit der Plasmamembran aus. Die Regeneration der synaptischen Vesikel erfolgt peripher zu der Aktiven Zone durch Endocytose. Von dort erfolgt ein Rücktransport der regenerierten Vesikel in das Innere der Präsynapse (Südhof, 2004; Becherer & Rettig, 2006).

Dieser Zyklus synaptischer Vesikel ist maßgeblich durch die Mitwirkung des Aktin-Cytoskeletts bestimmt (siehe Abb. 1.4). Die im Inneren einer Präsynapse befindlichen Reserve-Vesikel werden in einem Netzwerk aus Aktin-Filamenten und Synapsinen organisiert, das die frühzeitige Mobilisierung der Vesikel verhindert (Greengard et al., 1994; Siksou et al., 2007). Der Transfer dieser Vesikel aus dem Inneren der Präsynapse in die Aktive Zone erfolgt über Mikrofilament-abhängige Motorproteine (Abb. 1.4, Watanabe et al., 2005).

Direkt an der Aktiven Zone erfüllen Aktin-Filamente verschiedene Funktionen: Einerseits bauen Aktin-Filamente eine Barriere auf, die Vesikel von der vorzeitigen Fusion mit der Plasmamembran abhalten. Zum anderen könnte diese Barriere auch dazu dienen, für die Exocytose bestimmte Vesikel in der Aktiven Zone zu konzentrieren (Halpain, 2003).

Neben der Mobilisierung und Exocytose von Vesikeln ist das Recycling synaptischer Vesikel ebenfalls abhängig von der Organisation des Aktin-Cytoskeletts. Bereits zu Beginn der Endocytose werden die Effektoren der endocytotischen Maschinerie an Aktin-Filamenten direkt unterhalb der Plasmamembran lokalisiert (Kaksonen et al., 2006). Während der Knospung von Vesikeln wirkt das Aktin-Cytoskelett durch das Aufbauen von Zugkräften unterstützend.

Außerdem wird postuliert, dass für die letztendliche Abschnürung endocytotischer Vesikel lokal eine Depolymerisation des kortikalen Aktin-Cytoskeletts zu erfolgen hat (Qualmann et al., 2000). Zur Regeneration synaptischer Vesikel werden die endocytotisch entstandenen Vesikel Aktin-abhängig in das Zentrum der Präsynapse transportiert. Dieser Vorgang erfolgt über zwei wesentliche Mechanismen: Einerseits einen Vortrieb der Vesikel bedingt durch die Aktin-Polymerisation (Lanzetti, 2007) und andererseits werden die Vesikel auf bestehenden Aktin-Filamenten durch das sich retrograd bewegende Motorprotein Myosin VI aktiv transportiert. Über diese Mechanismen werden Vesikel nicht nur innerhalb einer Präsynapse, sondern auch zwischen benachbarten Präsynapsen transportiert (Abb. 1.4, Darcy et al., 2006).

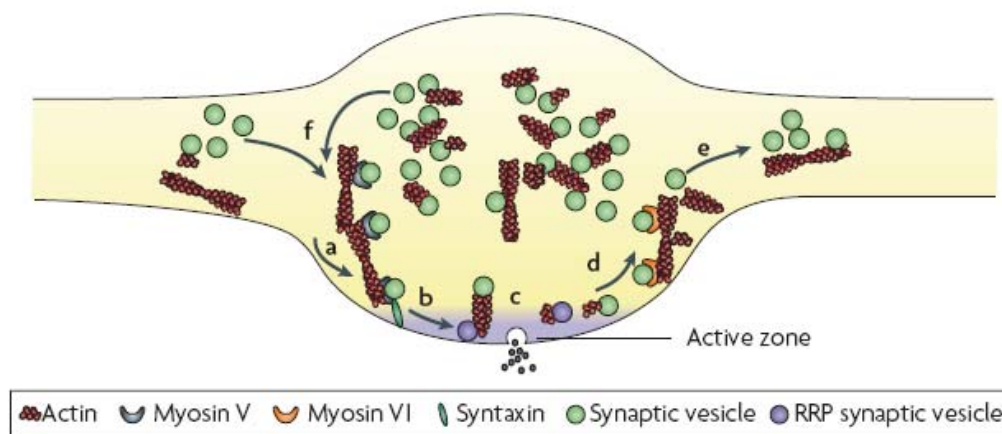


Abb. 1.4 Die Beteiligung des Mikrofilamentsystems an Prozessen des prä-synaptischen Vesikelzyklus

Darstellung des Vesikelzyklus im Zusammenhang mit der prä-synaptischen Aktin-Organisation. a) Vesikel des Reservepools werden Aktin-abhängig in die Aktive Zone für das „vesicle docking“ transportiert. b) Übertritt der Vesikel in den „ready releasable pool (RRP)“. c) Ausschüttung von Neurotransmittern durch Aktin-abhängige Exocytose von RRP-Vesikeln. d) Vesikel-Recycling peripher zur Aktiven-Zone durch Myosin VI. e) Transport synaptischer Vesikel zwischen Synapsen über Aktin-Filamente (übernommen aus Cingolani & Goda, 2008)

1.3.2 Das Aktin-Cytoskelett in exzitatorischen Postsynapsen

Aktin ist ebenfalls ein integraler Bestandteil postsynaptischer Strukturen. Dies gilt insbesondere für exzitatorische Postsynapsen, die überwiegend in Aktin-reichen dendritischen Fortsätzen, den so genannten „dendritic spines“, lokalisiert sind. Diese Strukturen, die bereits 1888 von Ramon y Cajal beschrieben worden sind, weisen eine äußerst vielseitige Morphologie auf (Abb. 1.5). Die Erscheinungsformen der „dendritic spines“ reichen von kleinen kompakten (stubby) über ausladende pilzförmige (mushroom) hin zu dünnen Strukturen (thin) (Yuste & Bonhöffer, 2004). Echtzeitbeobachtungen von „dendritic spines“ unter Verwendung von GFP-Aktin haben gezeigt, dass „dendritic spines“ in kürzester Zeit über das Aktin-Cytoskelett Veränderungen in ihrer Morphologie erfahren können (Fischer et al., 1998; Halpain et al., 1998; Star et al., 2002).

Aktuelle Hypothesen lassen vermuten, dass Aktin-abhängige Änderungen in Anzahl, Größe und Morphologie der „dendritic spines“ Veränderungen in der neuronalen Aktivität von Neuronen

wiederspiegeln (Fischer et al., 2000; Holtmaat et al., 2006). Folglich wird der Reorganisation von „dendritic spines“ als Aktin-abhängige strukturelle Plastizität eine Schlüsselrolle bei Vorgängen des Lernens und der Gedächtnisbildung zugeordnet (Bourne & Harris, 2007). So konnte gezeigt werden, dass je nach synaptischer Aktivität die Organisation des F-Aktins in „dendritic spines“ beeinflusst wird. Speziell durch Nutzung einer „fluorescence energy transfer (FRET)“-Technik konnte in Echtzeit der Polymerisationsgrad des Aktins direkt in „dendritic spines“ verfolgt werden. Durch Stimulationen der Neuronen unter Bedingungen, die als so genannte „long term potentiation (LTP)“ eine langanhaltende Verstärkung synaptischer Verbindungen zur Folge haben, wurde der Anteil an F-Aktin und, in Folge, das Volumen der „dendritic spines“ vergrößert. Dagegen führt die dauerhafte Schwächung von Synapsen per „long term depression (LTD)“ zu einer Erhöhung des G-Aktin-Anteils und der Schrumpfung von „dendritic spines“ (Fukazawa et al., 2003, Okamoto et al., 2004, Lin et al., 2005). Weiterführende Studien mit photoaktivierbarem GFP-Aktin haben gezeigt, dass in den Köpfen nahe der Postsynapse die Aktin-Filamente hochdynamisch sind, während die Mikrofilamente in den Halsen der „dendritic spines“ stabil sind. Eine Stimulation der exzitatorischen Synapsen vergrößert die Menge an dynamischen Filamenten in den Köpfen der „dendritic spines“ und führt zu deren Vergrößerung (Honkura et al., 2008).

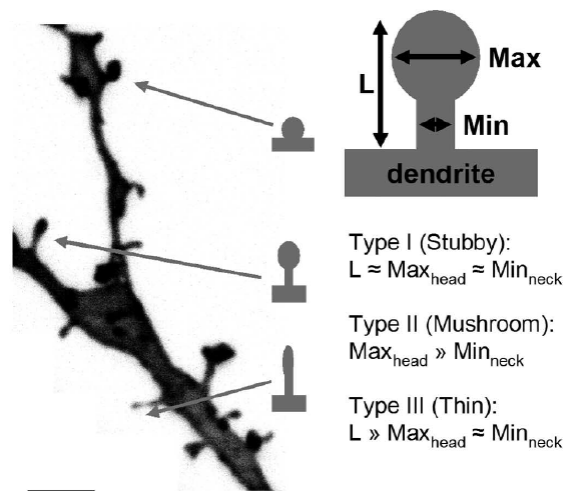


Abb. 1.5: Morphologie der „dendritic spines“

Verschiedene Erscheinungsformen der „dendritic spines“. In Abhängigkeit der Größenverhältnisse der dendritic spine-Köpfe und Hälse werden „dendritic spines“ in die Kategorien „stubby“, „thin“ und „mushroom“ eingeteilt. (übernommen aus Zagrebelsky et al., 2005)

In den Köpfen der „dendritic spines“ befinden sich Glutamat-Rezeptoren, von denen die α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoazolpropionat (AMPA)- und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren die Mehrheit bilden.

Diese Rezeptoren sind in ein kompaktes, laminar aufgebautes Proteinnetzwerk eingebunden, der postsynaptic density (PSD), die direkt gegenüber präsynaptischen Kompartimenten gelegen ist. Unterhalb der Plasmamembran binden eine Vielzahl von Adapterproteinen wie PSD95 und

The diagram illustrates the excitatory postsynaptic membrane and the underlying actin cytoskeleton. The membrane contains NMDA receptors (NR1 and NR2 subunits) and Neuroligin. Below the membrane, the actin cytoskeleton is organized into F-actin filaments. Key regulatory proteins include:

- PSD-95**, **Sh3**, **CRIP1**, and **APC** are associated with the membrane and actin.
- MAP1A** and **GuK** are involved in microtubule organization.
- PDZ domains** and **Pfn** (Pleckstrin homology domain) are associated with the actin filament.
- Citron** is a GTPase that regulates actin dynamics.
- ProSAP** is a scaffolding protein that interacts with **Abp1** and **Drebrin**.
- CaM** (Calcium/calmodulin) is associated with the actin filament.
- geisolin** is a protein that regulates actin dynamics.

The diagram shows the interaction between these proteins and the actin filament, highlighting the role of the actin cytoskeleton in the organization and function of the excitatory postsynaptic membrane.

Tetramere NMDA-Rezeptoren werden direkt unter der Plasmamembran durch Adapterproteine wie PSD95 und ProSAP gebunden. Durch die Interaktion mit Aktin-assoziierten Proteinen wird der Kontakt mit dem Aktin-Cytoskelett hergestellt (übernommen aus Jockusch et al., 2004).

Obwohl bei inhibitorischen Synapsen keine derart auffälligen Strukturen wie „dendritic spines“ vorhanden sind, ist auch in diesem Synapsen-Typ das Aktin-Cytoskelett von Bedeutung. Analog zu exzitatorischen Synapsen werden auch die Rezeptoren der inhibitorischen Synapsen durch ein postsynaptisches Gerüst organisiert. Im Gegensatz zur Vielzahl von Adapterproteinen in exzitatorischen Synapsen basiert das Gerüst hauptsächlich auf dem Protein Gephyrin (Jockusch et al., 2004). Dieses Gerüstprotein besteht aus einer N-terminalen G-Domäne und einer C-terminalen E-Domäne, die durch eine Poly-Prolin reiche Linker-Region verbunden sind. Durch Selbstassoziation in Form einer Trimerisierung über die G-Domänen und Dimerisierung der E-Domänen bilden Gephyrin-Moleküle hexagonale Cluster, in denen Glycin-Rezeptoren und die meisten Isoformen der Gamma-Aminobuttersäure-(GABA)-Rezeptoren organisiert werden (Sola et al., 2004; Lardi-Studler et al., 2007). Pharmakologische Experimente mit Cytotoxinen haben eine Assoziation von Gephyrin sowohl mit Mikrotubuli als auch mit dem Mikrofilamentsystem belegt (Abb. 1.7). Während die Depolymerisation der Mikrotubuli zu einer verringerten Anzahl postsynaptischer Gephyrin-Cluster

führt, bleibt während des Verlustes der Aktin-Filamente die Menge an Gephyrin-Clustern konstant (Kirsch & Betz, 1995). Jedoch verringern sich durch Depolymerisation der Aktin-Filamente die Abstände zwischen den Gephyrin-Rezeptor-Clustern und auch deren Größe (Kirsch & Betz, 1995). Mit Hilfe von Echtzeitbeobachtungen von Fluorochrom-markierten Gephyrin-Clustern und Glycin-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass nach Depolymerisation des Aktins die Rezeptoren eine erhöhte Membrandynamik besitzen und somit vermehrt aus den Synapsen diffundieren (Hanus et al., 2006; Charrier et al., 2006). Daher scheint die Plastizität inhibitorischer Synapsen auf dem Aktin-Cytoskelett-abhängigen Austausch von Proteinen zwischen synaptischen und extra-synaptischen Rezeptor-Gephyrin-Komplexen zu basieren (Kneussel & Loebrich, 2007).

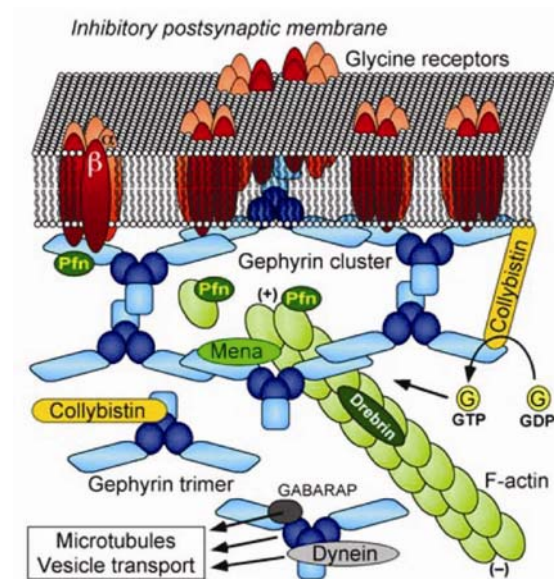


Abb. 1.7: Aufbau der PSD inhibitorischer Postsynapsen mit Glycin-Rezeptoren

Glycin-Rezeptoren werden durch ein Gerüst aus hexagonalen Gephyrin-Clustern organisiert. Diese stehen über Profilin und Mena mit dem Aktin-Cytoskelett in Kontakt (übernommen aus Jockusch et al., 2004).

Anhand biochemischer Experimente konnte belegt werden, dass die Assoziation von Gephyrin mit Mikrotubuli und dem Mikrofilament-System auf unterschiedlichen Mechanismen beruht (Jockusch et al., 2004). Während Gephyrin Mikrotubuli direkt bindet, erfolgt die Assoziation mit F-Aktin indirekt über die Aktin-assoziierten Proteinen VASP/Mena und Profilin (Kirsch et al., 1991; Hanus et al., 2006; Giesemann et al., 2003; Bausen et al., 2006). Der exakte Mechanismus, über den Rezeptor-Gephyrin-Komplexe mit Hilfe dieser Proteine mit dem Mikrofilamentsystem in Kontakt stehen, ist allerdings bisher unbekannt. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Profilin ist nicht auf inhibitorische Synapsen von Neuronen beschränkt. Dieses Protein besitzt eine Schlüsselposition in der Regulation der Aktin-Dynamik sowohl in neuronalen als auch nicht-neuronalen Zellen. Aufgrund der Interaktionen von Profilin mit einer Vielzahl verschiedener Liganden wird vermutet, dass dieses Protein neben der Aktin-Dynamik noch weit mehr zelluläre Prozesse reguliert. Im Folgenden werden daher die bisher bekannten Eigenschaften und Funktionen von Profilin näher erläutert.

1.4 Profilin

Profiline sind 14-17 kDa kleine, G-Aktin-bindende Proteine einer großen Genfamilie. Vor 30 Jahren wurde Profilin erstmals beschrieben, in dem es zusammen mit Aktin aus Kalbssmilz gereinigt wurde (Carlsson et al., 1977). Die Bezeichnung „Profilin“ resultiert aus dessen zu diesem Zeitpunkt zuerst beobachteter Eigenschaft, im Überschuss vorliegend die Aktinpolymerisation zu hemmen; Aktin also in einem „pro-filamentösen“ Zustand zu halten. Allerdings deuten die meisten weiterführenden Studien auf eine überwiegend polymerisationsfördernde Wirkung von Profilin. Seit der Entdeckung des Rinder-Profilin 1 wurden in bisher allen untersuchten Eukaryonten Profiline nachgewiesen. Sogar zwei Arten der Pockenviren und das Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa* verfügen in ihrem Genom über ein Profilin-Gen (Blasco et al., 1991; Butler-Cole et al., 2007; Guljamow et al., 2007). Tendenziell nimmt die Anzahl der Profilin-Gene innerhalb der Eukaryonten mit der Komplexität der Organismen zu. Einzellige Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Acanthamoeba castellanii* verfügen über ein Profilin-Gen bzw. zwei Profilin-Gene (Haarer et al., 1990; Kaiser et al., 1986). Der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, der sich an der Schwelle zu einem vielzelligen Organismus befindet, exprimiert drei Profilin-Isoformen (Arasada et al., 2007). In Mammalia konnten bisher vier Profilin-Gene identifiziert werden. Führend in der Anzahl unterschiedlicher Profiline innerhalb eines Organismus sind die Pflanzen mit bis zu zehn Profilin-Genen (Huang et al. 1996). Zusätzlich kann innerhalb eines Organismus durch alternatives Spleißen die Anzahl an exprimierten Profilin-Varianten erhöht sein. Sequenzvergleiche von Profilinen verschiedener Organismen ergaben, dass die Profiline mit einer Sequenzidentität von teilweise weniger als 25% einen hohen Grad an Divergenz aufweisen können (Pollard & Quirk, 1994). Die Einordnung eines Proteins in die Profilin-Familie beruht daher nicht auf Sequenzhomologien, sondern auf anderen Kriterien wie einer gemeinsamen Tertiärstruktur und charakteristischen biochemischen Eigenschaften.

1.4.1 Die Struktur von Profilin

Alle bisher erfolgten Strukturaufklärungen von Profilinen unterschiedlichster Herkunft deuten auf eine gemeinsame Tertiärstruktur hin: Ein aus sieben Strängen bestehendes kompaktes Beta-Faltblatt bildet das Zentrum des Moleküls, das von vier α -Helices umgeben ist. Die N- und C-Termini besitzen eine alpha-helikale Struktur und sind zueinander angeordnet. Durch diese Anordnung der Termini entsteht eine hydrophobe Bindungstasche (Abb. 1.8, Schutt et al., 1993; Fedorov et al., 1994; Fedorov et al., 1997; Domke et al., 1997).

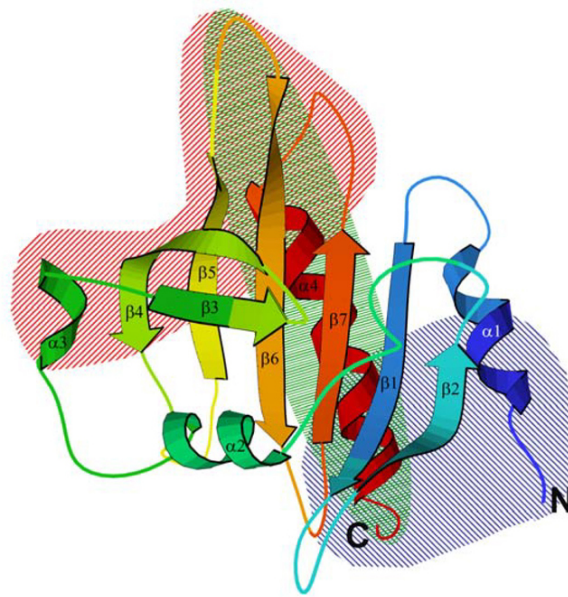


Abb. 1.8: Struktur des Rinderprofilin 1 mit den Bindungsregionen für G-Aktin (rot), Phospholipide (grün) und Poly-Prolin-Liganden (blau) (übernommen aus Jockusch et al. 2007)

Allerdings ist die konservierte Struktur nur bedingt ein Kriterium für die Einordnung eines Proteins in die Profilin-Familie. Im Laufe der Zeit wurden Profilin-ähnliche Proteine wie p14 oder Proteine mit einer Profilin-ähnlichen Domäne wie die SNARE-Proteine Sec22b und Ykt6 identifiziert (Qian et al., 2005; Gonzalez et al., 2001; Tochio et al., 2001). Diese Proteine wurden nicht als Profiline klassifiziert, da sie nicht in der Lage sind, die typischen Profilin-Liganden G-Aktin, Phosphatidylinositide und Proteine mit Poly-Prolin-Motive zu binden.

1.4.2 Liganden von Profilin

Durch Strukturanalysen von Profilin im Komplex mit G-Aktin, dem so genannten Profilaktin-Komplex, wurde gezeigt, dass Profilin unter Beteiligung der β -Faltblätter 4, 5 und 6 sowie der Alpha-Helices 3 und 4 die Subdomänen 1 und 3 des G-Aktin bindet (siehe Abb. 1.9, Schutt et al. 1993). Neben den verschiedenen Aktin-Isoformen interagiert Profilin mit dem „actin related protein 2 (Arp2)“ des Arp2/3-Komplexes, der die Nukleation neuer Aktin-Filamente katalysiert (Machesky et al., 1994; Mullins et al., 1998).

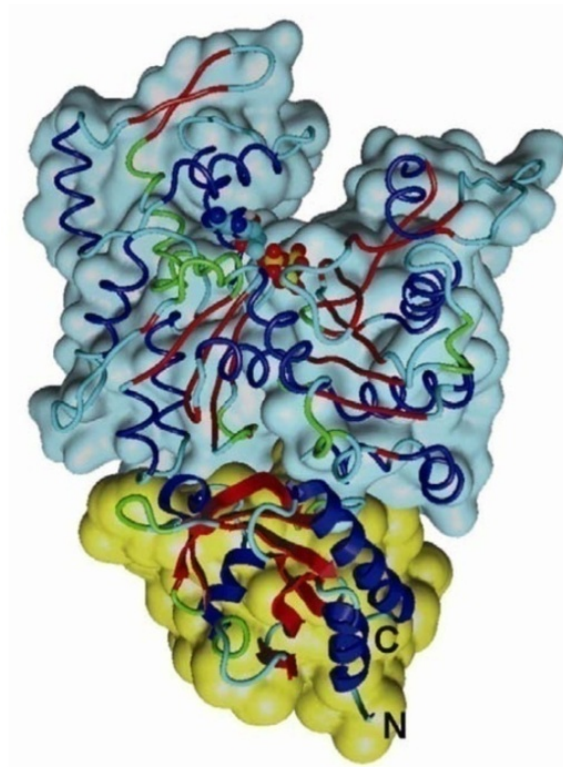


Abb. 1.9: Struktur des Komplexes aus Rinderprofilin 1 (gelb) und G-Aktin (blau)

(übernommen aus Jockusch et al. 2007)

Neben G-Aktin und Aktin verwandten Proteinen interagiert Profilin über die G-Aktin-Bindungsregion mit Gephyrin (Giesemann et al., 2003). Gephyrin erfüllt im Organismus zwei wesentliche Funktionen: Wie zuvor beschrieben, fungiert Gephyrin im zentralen Nervensystem als Gerüstprotein für Glycin-Rezeptoren und GABA-Rezeptoren (Fritschy et al., 2008). Darüber hinaus ist Gephyrin bzw. dessen Homologe an der Synthese des Molybdän-Cofaktors beteiligt, der für die Funktionalität vieler Enzyme essentiell ist (Stallmeyer et al., 1999).

Eine stetig wachsende Gruppe von Profilin-Liganden sind Proteine, die Poly-Prolin-Motive beinhalten. Zu Beginn der Erforschung von Profilin wurde eine hochaffine Bindung von Profilin zu synthetischen Poly-Prolin-Peptiden festgestellt (Tanaka & Shibata, 1985), die zur effizienten biochemischen Reinigung des Proteins genutzt wurde. Allerdings konnte in den darauffolgenden zehn Jahren nach der Entdeckung der Poly-Prolin-Bindung kein natürlicher Poly-Prolin-Ligand identifiziert werden. Erst mit dem „Vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP)“ wurde ein Protein als Poly-Prolin-Ligand von Profilin entdeckt (Reinhard et al., 1995). Seitdem wurde eine Vielzahl von weiterer Poly-Prolin-Liganden identifiziert, die in Tabelle 1 zusammen gefasst sind. All diesen Liganden sind Bindungsmotive für Profilin gemeinsam, die aus einem kontinuierlichen Bereich aus acht bis zehn Prolinen bestehen, die ggf. durch einzelne Glycine unterbrochen sind.

Tab. 1: Poly-Prolin-Liganden von Profilin

Profilin-Ligand	Referenzen
Ena/Mena/VASP-Proteine	Reinhard et al., 1995; Gertler et al., 1996
Formine	Watanabe et al., 1997; Krebs et al., 2001
WASP & WAVE	Suetsugu et al., 1998; Miki et al., 1998
Palladin	Boukelifa et al., 2006
Drebrin	Mammoto et al., 1998
Dynamin 1	Gareus et al., 2006
Survival motoneuron protein (SMN)	Giesemann et al., 1999
p42POP	Lederer et al., 2005
Prrp	Zhao et al., 2001
RIAM	Lafuente et al., 2004
Piccolo/Aczonin	Wang et al., 1999
Huntingtin	Shao et al., 2008

Als Bindungstasche für diese Poly-Prolin-Liganden wurde die hydrophobe Region des Profilins identifiziert, die durch die Anordnung der Termini gebildet wird (siehe Abb. 1.10, Mahoney et al., 1997). Da sich diese Bindungsregion direkt gegenüber der Aktin-Bindungstasche befindet, können in den meisten Fällen G-Aktin und Poly-Prolin-Liganden simultan durch Profilin gebunden werden.

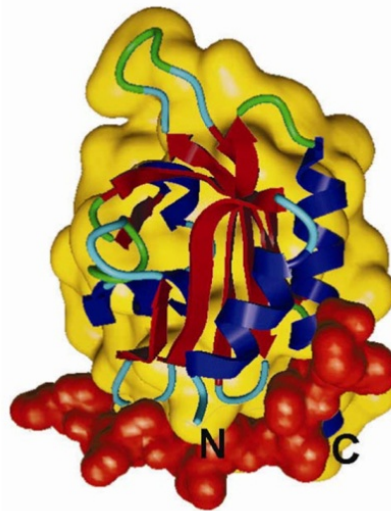


Abb. 1.10: Struktur von Rinderprofilin 1 (gelb) komplexiert mit einem Poly-Prolin-Peptid (rot)
(übernommen aus Jockusch et al. 2007)

Die Bindung der dritten Gruppe von Profilin-Liganden, der sauren Phospholipide, wurde erstmals anhand von Rinder-Profilin 1 und Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PIP_2) nachgewiesen (Lassing & Lindberg, 1985). Hierbei zeigte sich, dass PIP_2 mit G-Aktin um die Bindung an Profilin konkurriert und den Profilaktin-Komplex aufzulösen vermag.

Im Falle des humanen Profilin 1 konnte gezeigt werden, dass auch eine Konkurrenz mit Poly-Prolin erfolgen kann (Lambrechts et al., 2002). In Übereinstimmung mit dem beobachteten kompetitiven Bindungsverhalten der Liganden an Profilin 1 befinden sich die für die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Bindung entscheidenden Aminosäure-Reste sowohl im Bereich der Aktin-Bindungsdomäne als auch nahe des C-Terminus (siehe Abb. 1.8, Sohn et al., 1995; Lambrechts et al., 1997; Chaudhary et al., 2001; Lambrechts et al., 2002). Unklar ist allerdings, ob es sich insgesamt um eine zusammenhängende Domäne oder zwei separate Lipid-Bindungsmotive, jeweils in der Aktin-Domäne und nahe des C-Terminus, handelt. Gelfiltrationsexperimente mit quervernetzten Profilaktin-Komplexen und PIP₂ deuten auf letzteres hin (Skare & Karlsson, 2002).

1.4.3 Cytoplasmatische Funktionen von Profilin

Eine essentielle Funktion von Profilin in der Regulation der Aktin-Dynamik wird anhand von Organismen deutlich, in denen der Verlust von Profilin drastische Defekte bei Zellwachstum, Cytokinese und folglich in der Embryonalentwicklung hervorruft (Haarer et al., 1990; Verheyen & Cooley, 1994; Haugwitz et al., 1994; Witke et al., 2001; Severson et al., 2002; Rawe et al., 2006). Für die Art und Weise, wie Profilin das Aktin-Cytoskelett beeinflusst, wurden seit dessen Entdeckung verschiedene Mechanismen postuliert. Die bereits bei der Erstbeschreibung von Profilin entdeckte Inhibition der Aktin-Polymerisation bei *in vitro*-Experimenten führte zu der Hypothese, dass Profilin ein Faktor sei, der in der Zelle freies G-Aktin bindet und bereit hält (Karlsson et al., 1977). Quantifizierungen des Profilin-Gehaltes ergaben jedoch erhebliche Unterschiede in den untersuchten Organismen. Während in einzelligen Organismen die Menge an Profilin tendenziell ausreicht, um die vorliegende Menge an Aktin-Monomere zu binden, ist in den meisten höheren Eukaryonten für diese Funktion nicht genügend Profilin vorhanden (Southwick & Young, 1990; Kaiser et al., 1999). Hier erfolgt die Bindung des G-Aktin durch Thymosin β 4.

In biochemischen Analysen wurde ermittelt, dass die Interaktion mit Profilin die Nukleotid-Bindungstasche des gebundenen G-Aktins weitet und somit den Austausch von ADP zu ATP am G-Aktin-Molekül um das 140 fache beschleunigt (Goldschmidt-Clermont et al., 1991; Perełoizen et al., 1995; Selden et al., 1999). Mit der Entdeckung des beschleunigten Nukleotidaustausches wurde zunächst postuliert, dass Profilin lokal z.B. an der Führungslamelle sich bewegender Zellen die Aktin-Polymerisation durch die Bereitstellung von ATP-G-Aktin fördert (Goldschmidt-Clermont et al., 1991). Weitere Studien haben jedoch gezeigt, dass der polymerisationsfördernde Effekt von Profilin über die bloße Funktion als G-Aktin-spezifischer Nukleotidaustauschfaktor hinausgeht.

Neben der Katalyse des Nukleotidaustausches orientiert Profilin gebundene Aktin-Monomere optimal für deren Bindung an die schnell wachsenden Enden von Aktin-Filamenten (Minehardt et al., 2006). Dies geschieht in Kooperation mit Poly-Prolin-Liganden aus den Familien der VASP/Ena- bzw. WASP/WAVE-Proteine und den Forminen, die nicht nur mit Profilin, sondern mit höherer Affinität

mit Profilaktin-Komplexen interagieren. Durch *in vitro*-Experimente wurde belegt, dass die Elongation von Aktin-Filamenten durch VASP und Formine erheblich durch die Anwesenheit von Profilin beschleunigt wird (Walders-Harbeck et al., 2002; Romero et al., 2004; Michelot et al., 2005, Kovar et al., 2006). Diese Befunde konnten kürzlich erstmals anhand von Strukturanalysen bestätigt werden. Proteine wie VASP oder mDia1 verfügen über repetitive Poly-Prolin-Motive, an die simultan mehrere Profilaktin-Komplexe gebunden werden können. Somit steht für eine schnelle Aktin-Polymerisation eine große Menge an optimal orientierten G-Aktin-Molekülen zur Verfügung, die über einen Lademechanismus unter Dissoziation von Profilin an die Enden der VASP bzw. mDia1-gebundenen Aktinfilamente addiert werden (Ferron et al., 2007; Kursula et al., 2008). Aufgrund der Akkumulation dieser Poly-Prolin-Liganden in der Führungslamelle sich bewegender Zellen und in Adhärenzverbindungen ist Profilin wesentlich an der Zellmigration und der Zelladhäsion beteiligt (siehe Abb. 1.11).

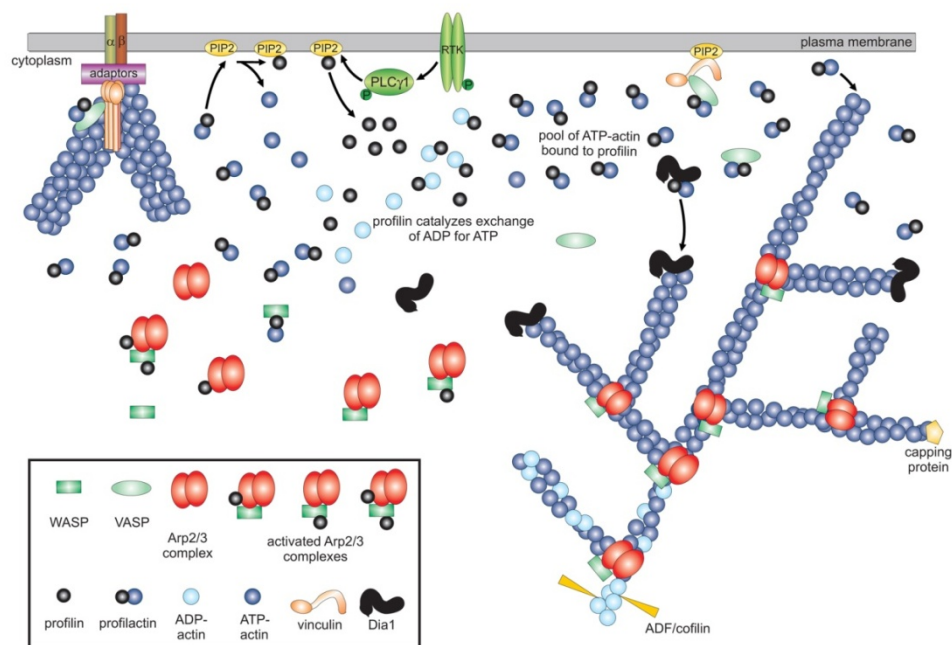


Abb. 1.11: Darstellung ausgewählter Aktin-abhängiger Prozesse an der Plasmamembran unter Beteiligung von Profilin (übernommen aus Jockusch et al. 2007)

Neben der Kooperation von Profilin mit Mikrofilament-assoziierten Proteinen bei der Aktin-Polymerisation wird vermutet, dass Profilin die Funktion anderer Poly-Prolin-Liganden über direkte Interaktion regulieren kann. Ein Beleg für diese Hypothese ist z.B. die Profilin-abhängige Regulation der GTPase Dynamin 1, die für die finale Abschnürung endocytotischer Vesikel verantwortlich ist (Kruchten & McNiven, 2006, Gareus et al., 2006).

1.4.3 Funktionen von Profilin im Zellkern

Obwohl die Mehrheit der Profilin-Liganden überwiegend im Cytoplasma zu finden ist, wurden im Laufe der Zeit mehr und mehr Profilin-Liganden im Nucleus identifiziert. Anhand der Interaktion von Profilin mit dem "survival motoneuron protein (SMN)" und p80coilin sowie der Lokalisation in Kern-Subkompartimenten wie Spleißosomen, „gems“ und „Cajal-bodies“ wird postuliert, dass Profilin 1 die Prozessierung von mRNAs beeinflusst (Giesemann et al., 1999; Skare et al., 2003, Sharma et al., 2005).

Neben einer Beteiligung an Spleißvorgängen existieren Hinweise, dass Profilin zudem Einfluss auf die Transkription nimmt. Ein Beispiel dafür ist die Modulation der Transkription durch Profilin über die Interaktion mit dem kürzlich identifizierten Myb-verwandten Transkriptionsfaktor p42POP. In Reporter-gen-Experimenten konnte demonstriert werden, dass die reprimierende Wirkung von p42POP auf die Genexpression durch die Wechselwirkung mit Profilin gehemmt wird (Lederer et al., 2005).

Abgesehen von Prozessen der Genregulation scheint Profilin eine Rolle beim Export überschüssigen Aktins aus dem Zellkern zu spielen. Der Faktor Exportin 6 erkennt spezifisch Profilin gebundenes G-Aktin und transportiert diesen Komplex aus dem Zellkern (Stüven et al., 2003). Ob Profilin zusammen mit Aktin in weitere Prozesse im Zellkern involviert ist, ist bisher noch unbekannt.

1.4.4 Profilin-Isoformen in Mammalia

Da die Regulation der Aktin-Dynamik durch Profilin in allen eukaryontischen Zellen essentiell ist, blieben bisher die Funktionen von verschiedenen Profilin-Isoformen innerhalb eines Organismus weitestgehend unverstanden. Insbesondere angesichts der Tatsache, dass Profileine unterschiedlichster Herkunft auch Funktionen in fremden Organismen übernehmen können. Für Birkenprofilin konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es *in vitro* die Polymerisation des muskelspezifischen α -Aktin beeinflusst und analog zu humanen Profilin 1 bei Überexpression Aktin-Filamente stabilisiert (Giehl et al., 1994; Finkel et al., 1994; Rothkegel et al., 1996). Der Phänotyp von Profilin 1- und 2-defizienten Dictyostelien, die in ihrer Aktin-Organisation, Cytokinese und Entwicklung beeinträchtigt sind, konnte durch das Einbringen von exogenem Mais- oder Rinder-Profilin behoben werden (Haugwitz et al., 1994; Karakesisoglou et al., 1996; Schlüter et al., 1998).

Aufgrund der teils entwicklungsabhängigen, teils gewebespezifischen Expressionsmuster der verschiedenen Profilin-Isoformen in höheren Organismen wird jedoch vermutet, dass diese Profileine zelltypspezifische Funktionen erfüllen. In Mammalia konnten bislang vier Profilin-Gene identifiziert werden, über die fünf Profilin-Isoformen exprimiert werden. Bei Profilin 1 handelt es sich um das von Karlsson und Mitarbeiter (1977) zuerst identifizierte Profilin. Diese Profilin-Isoform wird in allen Geweben exprimiert und ist essentiell für Zellwachstum und Zellproliferation.

Entsprechend führt die Deletion des *pfn1*-Gens in Mäusen zu einem raschen Abbruch der Embryonalentwicklung (Witke et al., 2001). Zudem wurde Profilin 1 im Menschen als Tumorsuppressor identifiziert, dessen verminderte Genexpression erheblich zur Aggressivität von Mammakarzinoma beiträgt (Janke et al., 2000; Wittenmayer et al., 2004; Zou et al., 2007).

Durch alternatives Spleißen werden zwei Varianten von Profilin 2 gewebespezifisch exprimiert: Profilin 2a, das überwiegend im zentralen Nervensystem (ZNS) zu finden ist, und Profilin 2b, das in der Niere exprimiert wird (Honore et al., 1993; Lambrechts et al., 1995; Witke et al., 1998; Di Nardo et al., 2000). Zusätzlich zu den Profilin 2-Isoformen konnten Testis-spezifische Profileine identifiziert werden: Profilin 3, das während der späten Spermatogenese exprimiert wird und das kürzlich entdeckte Profilin 4, dessen Expression bereits in einer früheren Phase der Spermatogenese stattfindet (Hu et al., 2001; Braun et al., 2002; Obermann et al., 2005). Profilin 4 weist die geringste Homologie mit den übrigen Mammalia-Profilinen auf und wurde bisher noch nicht biochemisch charakterisiert.

Im Detail wurden bisher nur die biochemischen Eigenschaften der Profileine 1 und 2a untersucht: Diese Isoformen verfügen über eine annähernd gleiche Affinität zu G-Aktin; unterscheiden sich jedoch in der Bindungsstärke zu Phospholipiden und Poly-Prolin-Liganden. Profilin 1 bindet mit höherer Affinität PIP_2 , während Profilin 2a wesentlich stärker mit Poly-Prolin-Motiven wechselwirkt (Lambrechts et al., 1997).

1.4.5 Bekannte Funktionen der Profilin-Isoformen 1 und 2a im zentralen Nervensystem

Die Co-Expression zweier Profilin-Isoformen im ZNS, die 65% Sequenzidentität teilen und zudem *in vitro* ähnliche biochemische Bindungseigenschaften zeigen, wirft die Frage auf, ob sich diese Proteine redundant zueinander verhalten oder verschiedene Funktionen wahrnehmen. Für beide Isoformen sind Interaktionen mit synaptischen Proteinen wie Aczonin/Piccolo, Gephyrin, Delphinin, Drebrin etc. beschrieben (Wang et al., 1999; Giesemann et al., 2003; Myiagi et al., 2002; Mammoto et al., 1998). Trotz gemeinsamer Liganden wurden den unterschiedlichen Profilinen bisher zunehmend verschiedene Funktionen zugeordnet.

Profilin 1, dessen Funktion weitestgehend in nicht-neuronalen Zellen untersucht wurde, macht mit 25% nur einen relativ kleinen Anteil des Profilin-Gehaltes im ZNS der Maus aus (Witke et al., 2001). Studien, in denen Profilin 1 in Neuroblastoma-Zellen überexprimiert wurde, deuten auf eine generelle Beteiligung dieser Profilin-Isoform in der Neuritogenese hin (Lambrechts et al., 2006). Das mehrheitlich vorliegende Profilin 2a scheint hingegen nur einen tempoäreren Einfluss auf die Neuritenbildung zu haben (Da Silva et al., 2003). Kürzlich durchgeführte Studien mit Profilin 2a defizienten Mäusen bestätigten, dass der Einfluss von Profilin 2a auf den Prozess der Neuritogenese nicht essentiell zu sein scheint (Pilo-Boyl et al., 2007).

Andere Studien, in denen in kultivierten Neuronen Profileine mit einem C-terminalen GFP-Fusionsanteil überexprimiert wurden, lassen stattdessen eine Rolle von Profilin 2a in der strukturellen

Plastizität exzitatorischer Postsynapsen vermuten. In den transfizierten Neuronen löste die Stimulation der NMDA-Rezeptoren eine Akkumulation von Profilin 2a-GFP in „dendritic spines“ aus (Ackermann & Matus, 2003). Zusätzlich wurde unter analogen Bedingungen eine Translokation von Profilin 2a-GFP in die Zellkerne kultivierter Neurone beobachtet (Birbach et al., 2006). Für exogenes Profilin 1-GFP konnte ein solches Verhalten nicht festgestellt werden. Allerdings ist durch die biochemische Charakterisierung von GFP-Profilinen bekannt, dass Profilin 1 mit einem C-terminalen GFP-Fusionsanteil massiv in der Ligandenbindung beeinträchtigt und somit nur eingeschränkt funktionell ist (Wittenmayer et al., 2000). Die Beeinträchtigung des Profilin-GFP-Fusionsproteins ist eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Überexpressionsexperimenten und einer Lokalisationsstudie, in der eine signifikante Translokation von endogenem Profilin 1 in Synapsen beobachtet wurde (Neuhoff et al., 2005). Gestützt wird die Hypothese einer Beteiligung von Profilin an Vorgängen postsynaptischer Plastizität durch eine Studie, in der eine lernabhängige Akkumulation von Profilin in „dendritic spines“ von Ratten-Amygdalae festgestellt wurde (Lamprecht et al., 2006). Aufgrund des verwendeten kreuzreagierenden anti-Profilin-Serums konnte jedoch nicht ermittelt werden, welche Profilin-Isoform vermehrt in den „dendritic spines“ der Amygdala lokalisiert.

Für Profilin 2a wird eine bedeutende Rolle in der Regulation von Endocytose und Exocytose in Neuronen postuliert. Affinitätschromatographische Experimente, in denen mittels immobilisiertem Profilin 1 oder Profilin 2a Liganden aus Hirn-Lysaten extrahiert und per MALDI-TOF identifiziert wurden, zeigten, dass einzig Profilin 2a mit Effektoren der Endocytose und Exocytose interagiert (Witke et al., 1998). Detaillierte Untersuchungen der Wechselwirkung von Profilin 2a mit der GTPase Dynamin 1 lassen auf eine Inhibition der Endocytose durch Profilin 2a schließen (Gareus et al. 2006). Profilin 2a scheint hierbei mit akzessorischen Proteinen der Endocytose kompetitiv um eine Bindung an Dynamin 1 zu konkurrieren. Somit könnte Profilin 2a die durch Dynamin 1 katalysierte Abschnürung endocytotischer Vesikel inhibieren und folglich das Recycling synaptischer Vesikel regulieren (Gareus et al., 2006). Die Analyse Profilin 2a-defizienter Mäuse, die schwere Verhaltensstörungen wie Hypernervosität und Hyperaktivität aufweisen, belegten außerdem einen Defekt in der Regulation der präsynaptischen Vesikel-Exocytose. Aufgrund des Verlustes von Profilin 2a scheint die Organisation des Aktin-Cytoskeletts in der Präsynapse derart verändert zu sein, dass sich vermehrt synaptische Vesikel im Zustand des „vesicle docking“ und „vesicle priming“ befinden. Folglich kommt es in diesen Tieren zu einer überhöhten Neurotransmitter-Ausschüttung während der synaptischen Transmission (Pilo-Boyl et al., 2007).

Anhand dieser unabhängig voneinander erzielten Daten ist es nicht einfach zu bewerten, ob Profilin 2a nun maßgeblich in Prozessen der Präsynapsen oder an der synaptischen Plastizität in Postsynapsen beteiligt ist. Insbesondere, da die Befunde zur Lokalisation von Profilin 2a in den verschiedenen Studien konträr sind: Pilo-Boyl und Mitarbeiter (2007) konnten in Zellfraktionierungsexperimenten keine signifikante Menge an endogenem Profilin 2a in PSD-Fractionen nachweisen. Hingegen gelang einer anderen Forschergruppe in vergleichbaren Experimenten unter Verwendung des gleichen

Profilin-Antiserums der Nachweis einer erheblichen Menge an Profilin 2a in postsynaptischen Strukturen (Schubert et al., 2006).

Abgesehen von den unterschiedlichen Resultaten zur zellulären Funktion von Profilin 2a ist unbekannt, inwiefern Profilin 1 an solchen Prozessen mitwirkt. Bisher wurde nur beschrieben, dass die Expression beider Profile in Patienten mit Chorea Huntington erheblich reduziert ist. Passend zu diesem Befund soll in Huntington betroffenen Neuronen des Cerebellums und Cortex die Aktin-Dynamik gestört sein (Burnett et al., 2008).

1.5 Aufgabenstellung

In den meisten bisherigen Studien wurden die Profilin-Isoformen 1 und 2a getrennt voneinander betrachtet. Folglich wurde ein Gesamtbild der möglichen funktionellen Diversität dieser Profile aus Daten separater Studien erstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hingegen gleichzeitig untersucht, welche Funktionen sowohl von Profilin 1 als auch Profilin 2a wahrgenommen werden. Hierfür war zunächst die Generierung von Profilin-Isoform spezifischen Antikörpern vorgesehen werden, die für biochemische, aber im Besonderen auch für immunhistochemische Anwendungen geeignet sind. Ziel war es, mittels dieser Antikörper zu untersuchen, ob die Profilin-Isoformen 1 und 2a in Neuronen in unterschiedlichen Kompartimenten co-lokalisieren. Zur weiteren Funktionsanalyse der Profilin-Isoformen sollte ein RNA-Interferenz (RNAi)-Vektorsystem etabliert werden, mit dem in Neuronen spezifisch die Expression einer Profilin-Isoform gehemmt werden kann. Zusätzlich sollten Mutationen in Profilin 2a erzeugt werden, die zu einer möglichst vollständigen Inhibition der Aktin- oder der Poly-Prolin-Bindung führen. Durch die Kombination der RNA-Interferenz des endogenen Profilins und der gleichzeitigen Expression mutierter Profile bzw. anderer Profilin-Isoformen sollte ein neuartiges Verfahren angewendet werden, mit dem die Funktionen der Profile 1 und 2a in neuronalen Prozessen analysiert werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Spektralphotometer Ultrospec 2100 pro, Biochrom LTD, Cambridge, UK
CO₂-Inkubator Stericult 200, Labotect, Göttingen
Ultra-Turrax T25, IKA Labortechnik, Staufen
Kühlzentrifuge J2-MC, Beckmann, München
Ultrazentrifuge LE-70, Beckmann, München
Kühlzentrifuge 3K15, Sigma, Osterode am Harz
Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus, Hanau
PCR-Cycler Peltier Thermal Cycler PTC 200, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA
ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems GmbH, Weiterstedt
Geldokumentationsanlage Herolab GmbH, Wiesloch
UV-Leuchttisch E.A.S.Y. RG, Herolab GmbH, Wiesloch
Transilluminator Biometra, Göttingen
Agarose Gelelektrophoreseapparatur Nautico 810, Labortechnik Fröbel, Lindau
Vertikal-Minigel-Elektrophoreseinheit, Sigma, Steinheim
Dynatech MRX, Dynatech, Guernsey, UK
Fastblot B44, Biometra, Göttingen
Sonifier®B12, Branson Sonic Power Company, Danbury Connecticut, USA
FPLC, GE Healthcare München
Äkta Purifier, GE Healthcare München
Spektralfluorimeter LB50, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Fluoreszenzmikroskop Axiophot, Zeiss, Göttingen
Confocal Laser Scanning-Mikroskop LSM Meta 510, Zeiss, Göttingen
„Protean IEF-focusing“-Kammer, BioRad, München
Software: LSM Browser, Metamorph®, ImageJ, Adobe Photoshop CS2, Microsoft Office,
Lasergene-DNAStar, Herolab easywin
P1-Pumpe (GE Healthcare, München)
Gilson-FC203-B Fraktionssammler (Gilson, Limburg, Offheim)
French Press, Amerinco, Minneapolis, USA

2.1.2 Chemikalien & Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma Aldrich (Deisenhofen), MP Medicals (Eschwege) und Invitrogen (Karlsruhe).

Als Bezugsquellen für Enzyme dienten die Firmen New England Biolabs (Bad Schwalbach), Fermentas (St. Leon-Rot), Stratagene (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), PAA Laboratories (Cölbe), Promega (Mannheim) und Appligene (Heidelberg). Die synthetische cDNAs für Human-Profilin 1, Hühner-Profilin 1 und Maus-Profilin 2a wurden von der Firma Geneart (Regensburg) bezogen. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide wurden von der Firma Operon (Köln) synthetisiert.

2.1.3 Bakterienstämme

Zur Klonierung sowie Expression rekombinanter Proteine wurden folgende *Escherichia coli*-Stämme verwendet:

- XL1-Blue mit folgendem Genotyp: endA1, gyrA96, hsdR17(r_k⁻m_k⁺), lac, recA1, relA1, supE44, thi-1, F['][proAB, lacI^qZVM15, Tn10] (Stratagene)
- BL21(DE3) plyS codonplus RIPL mit dem Genotyp: *E. coli* B F⁻ ompT hsdS (rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Camr] [argU ileY leuW Strep/Specr] (Stratagene)
- ER2566 mit dem Genotyp: F⁻λ-fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]. (New England Biolabs)

2.1.4 Eukaryontische Zellen

Für die funktionelle Analyse der Profilin-Isoformen 1 & 2a wurden folgende Zellen bzw. Zelllinien verwendet:

- HeLa-Zellen: Humane epitheliale Cervixkarzinomzelllinie (Scherer et al., 1953)
- Primäre, embryonale Hühnerfibroblasten (E12)
- Dissoziierte murine Hippocampus-Neurone (E18,5, von Kristin Michaelsen (TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt)
- Dissoziierte Hippocampus-Neurone, isoliert aus Ratten-Embryonen (E19, von Nina Wittenmayer (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt).

2.1.5 Vektoren

Die Expression rekombinanter Profilin ohne Fusionsanteil erfolgte in BL21 (DE3) *E. coli* auf der Grundlage der pET-Expressionsvektoren (Novagen). Der verwendete Vektor pET21c(+) besitzt einen IPTG induzierbaren T7-Promotor. Profilin 2a sowie dessen Mutanten wurden über den pET21c(+)-Vektor exprimiert, wobei durch die Insertion des ORF die Bildung eines Fusionsproteins mit einem His-tag vermieden wurde. Als Selektionsmarker verfügt der pET21c(+)-Vektor über eine Ampicillin-Resistenz.

Rekombinante Profilin mit einem sogenannten Intein-Tag wurden über das Impact-CN System (NEB) in BL21 ER2566 *E. coli* exprimiert. Über den Expressionsvektor pTYB12 wurde Profilin 2a sowie dessen Poly-Prolin-Mutante in der Form exprimiert, so dass die rekombinanten Proteine N-terminal mit einem autoproteolytisch abspaltbaren Intein-tag versehen waren. Wie der pET21c(+)-Vektor verfügt der pTYB12-Vektor über eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker.

Für die Expression von Profilinen in eukaryontischen Zellen wurde zum einen der Vektor pcDNA3 (Invitrogen) eingesetzt. Dieser Vektor verfügt über die Selektionsmarker Ampicillin für die Amplifikation des Vektors in Bakterien und Genticidin (G418) zur Etablierung stabil transfizierter eukaryontischer Zellen. Zusätzlich wurde der Vektor pcDNA3 mit einer cDNA codierend für das Birkenprofilin (BiPro)-Tag modifiziert, so dass Bipro-Profilin-Fusionsproteine entstanden.

Profilin-Fusionsproteine mit einem N-terminalen GFP bzw. YFP-Fusionsanteil wurden über die „Living Colour“-Expressionsvektoren pEGFP-C2 und pEYFP-C2 (Clontech) in eukaryontischen Zellen exprimiert. Diese Vektoren besitzen als Selektionsmarker Kanamycin für die Vervielfältigung des Vektors in Bakterien und Genticidin (G418) zur Generierung stabil transfizierter eukaryontischer Zellklone.

Die RNAi-Experimente dieser Arbeit in humanen und murinen Zellen basieren auf dem Vektor pRNAT-U6.3 (Genscript, Piscataway, USA). „Short hairpin RNA“ (shRNA) werden durch den humanen U6-Promotor transkribiert, der im pRNAT U6.3-Vektor zusätzlich durch einen Enhancer des Cytomegalie-Virus (CMV)-Promoters verstärkt ist. Zur Amplifikation in Bakterien codiert der Vektor für eine Ampicillin-Resistenz. Stabil transfizierte Zellen können über eine Hygromycin-Resistenz selektioniert werden.

Für RNAi-Experimente in kultivierten Hühnerfibroblasten wurde das miRNA-Vektorsystem von Invitrogen verwendet. Die humane miRNA mir155, in die genspezifische siRNA-Sequenzen eingebracht werden, steht in dem Vektor pcDNA 6.2 EmGFP-miR unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Über diesen Promotor wird eine bicistronische mRNA gebildet, die neben der miRNA auch für den Reporter GFP codiert. Transformierte Bakterien per Spectinomycin (200 µg/ml) selektioniert. Stabil transfizierte Zellen können über eine Selektion mit Blasticidin hergestellt werden.

Zur Darstellung von „dendritic spines“ in dissoziierten Neuronen wurde der lentivirale Vektor FUGW(Syn)GFP-F verwendet, in dem der CFPmem-Reporter unter der Kontrolle des Synapsin-Promotors steht. Transformierte Bakterien werden per Ampicillin-Resistenz selektioniert.

Folgende Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Martin Rothkegel (TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt:

- pET21c(+)-mPFN2a/h
- pET21c(+)-mPFN2a/h Y133S
- pcDNA3-Bipro-hPFN1 mod
- pET21c(+)-mPFN2a/h R74E mod

Der lentivirale Vektor FUGW(Syn)CFPmem wurde freundlicherweise von Dr. Nina Wittenmayer (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Nähere Angaben zu den Vektoren sind dem Anhang zu entnehmen.

2.1.6 Oligodesoxynukleotide

Die für die DNA-Sequenzierung von Plasmiden eingesetzten Oligodesoxynukleotide sind in der Tabelle 2.1 aufgelistet:

Tab. 2.1: Liste der verwendeten Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Vektor	5'-3'Sequenz	Orientierung
T7-Promoter-Primer	pET21c pcDNA3	TAATACGACTCACTATAGG	Forward
T7-Terminator-Primer	pET21c pTYP12	CGCTGAGCAATAACTAGC	Reverse
Sp6-Primer	pcDNA3	CTATTTAGGTGACACTATAG	Reverse
GFP-5'-Primer	pEGFP-C2 pECFP-C2 pEYFP-C2	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	Forward
GFP-3'-Primer	pEGFP-C2 pECFP-C2 pEYFP-C2	GGTTCAGGGGGAGGTGTGGG	Reverse
pRNA-U6-forward	pRNAT U6.3	TACGATACAAGGCTGTTAGAGAG	Forward
pRNA-reverse	pRNAT U6.3	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Reverse
pRNAT-cGFP-Seq	pRNAT U6.3	CAAACCACAAC TAGAATGCAG	Reverse
Intein-forward-Primer	pTYP12	CCC GCCGCTGCTTTTGCACGTGAG	Forward
miRNAreverse	pcDNA6.2-EmGFP-miR	ACAAAGTGGTTGATCTAGAG	Reverse

Für die Vektor basierte RNA-Interferenz wurden für shRNA bzw. miRNA codierende Oligonukleotide hybridisiert und in die Vektoren pRNATU6.3 bzw. pcDNA6.2-EMGFP-miR kloniert. Die Oligonukleotide, durch die die Expression der Zielgene effektiv ausgeschaltet wurden, sind aus Tabelle 2.2 ersichtlich. Die Abkürzungen „s“ und „as“ zeigen die Orientierung der Oligonukleotide in „sense –s“ und „antisense – as“ an.

Tab. 2.2 Liste der Oligonukleotide für die RNA-Interferenz von Profilin 1 und 2a

Bezeichnung	Vektor	Spezifität	5'-3'-Sequenz
siRNA 1.3_s	pRNATU6.3	mPFN1	GATCCCGTTGTTGATCAAACCACCGTGGTTGATATCCGCCACGGTGGTTTG ATCAACAATTTTTTCCAAA
siRNA 1.3_as	pRNATU6.3	mPFN1	AGCTTTTGGAAAAAATTGTTGATCAAACCACCGTGGCGGATATCAACCACG GTGGTTTGTATCAACAACGG
siRNA 2.13_s	pRNATU6.3	mPFN2a	GATCCGGATAACCTGATGTGCGATGGCGAACCATCGCACATCAGGTTATCC TTTTTTA
siRNA 2.13_as	pRNATU6.3	mPFN2a	AGCTTAAAAAAGGATAACCTGATGTGCGATGGTTCGCCATCGCACATCAG GTTATCCG
miRNA ch1.3_s	pcDNA6.2- EmGFP-miR	chPFN1	TGCTGATCACCAACACTATCGTCTTGTTTTGGCCACTGACTGACCAAGAC GAGTGTTGGTGAT
miRNA ch1.3_as	pcDNA6.2- EmGFP-miR	chPFN1	CCTGATCACCAACACTCGTCTTGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCAAGACGAT AGTGTTGGTGATC
miRNA ch1.5_s	pcDNA6.2- EmGFP-miR	chPFN1	TGCTGATCTCGTAGCACTTCTTATTGGTTTTGGCCACTGACTGACCAATAAG ATGCTACGAGAT
miRNA ch1.5_as	pcDNA6.2- EmGFP-miR	chPFN1	CCTGATCTCGTAGCATCTTATTGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCAATAAGAA GTGCTACGAGATC
miRNA chU2.3_s	pcDNA6.2- EmGFP-miR	chPFN2a	TGCTGTGGTGATGAAGACAGTTGCTAGTTTTGGCCACTGACTGACTAGCAA CTCTTCATCACCA
miRNA chU2.3_as	pcDNA6.2- EmGFP-miR	chPFN2a	CCTGTGGTGATGAAGAGTTGCTAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTAGCAACTG TCTTCATCACCAC
miRNA chU2.6_s	pcDNA6.2- EmGFP-miR	chPFN2a	TGCTGAACACAAACTACCATCTACAGGTTTTGGCCACTGACTGACCTGTAG ATTAGTTTGTGT
miRNA chU2.6_as	pcDNA6.2- EmGFP-miR	chPFN2a	CCTGAACACAAACTAATCTACAGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTGTAGAT GGTAGTTTGTGTTC

Zur Generierung von Profilin 2a-Mutanten wurden mittels Orts gerichteter Mutagenese einzelne Triplets der PFN2-cDNAs verändert. Die eingesetzten Primer sind aus Tabelle 2.3 ersichtlich. Unter „Spezifität“ ist die aus der Mutagenese resultierende Aminosäure-Substitution sowie die jeweilige eingesetzte cDNA, die Wildtyp-Sequenz (WT) oder synthetisch hergestellte cDNA (mod), angegeben.

Tab. 2.3: Liste der Primer zur Mutagenese von Profilin 2a

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz	Spezifität
km-003s	AGACCGGGAAGGTTTCGCTACCAACGTTTGA	mPFN2a WT F59A
km-003as	AGTCAAACCGTTGGTAGCGAAACCTTCCCGGTCT	mPFN2a WT F59A
km-002s	CTACTGCGACGCCAAATCCGTCTGGGCAGCCACG	mPFN2a Y29S WT
km-002as	CGTGGCTGCCCAGACGGATTTGGCGTCGCAGTAG	mPFN2a Y29S WT
km14s	GCACAATGGACATCGAGACAAAGAGTCAAGGTG	mPFN2a R88E WT
km14as	CACCTTGACTCTTTGTCTCGATGTCCATTGTGC	mPFN2a R88E WT
km-007s	GGACAGGGAGGGCTTCGCCACCAACGGCCTGACC	mPFN2a F59A mod
km-007as	GGTCAGGCCGTGGTGGCGAAGCCCTCCCTGTCC	mPFN2a F59A mod
km-009s	GATACTGCGACGCCAAGTCTGTGTGGGCCGCCAC	mPFN2a Y29S mod
km-009as	GTGGCGGCCACACAGACTTGGCGTCGCAGTATC	mPFN2a Y29S mod
km010s	GCATGGCCAAGTCCCTGAGGGACAGCGGCTTCTG	mPFN2a Y133S mod
km010as	CAGAAGCCGCTGTCCCTCAGGGACTTGGCCATGC	mPFN2a Y133S mod
km011s	GACTGTACAATGGACATCGAAACCAAGAGCCAGG	mPFN2a R88E mod
km011as	CCTGGCTCTGGTTTCGATGTCCATTGTACAGTC	mPFN2a R88E mod

Oligonukleotide, die für die Generierung von Restriktionsschnittstellen in Plasmiden verwendet wurden, sind in der Tabelle 2.4. Angegeben sind der Zielvektor, die generierte Schnittstelle sowie deren Position innerhalb des Zielvektors

Tab. 2.4: Primer zur Genierung zusätzlicher Schnittstellen in Plasmiden

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz	Spezifität
km013s	GCAGCTTATAATGGGCCCAAATAAAGCAATAGC	pRNAT U6.3, ApaI, 2294 bp
km013as	GCTATTGCTTTATTTGGGCCATTATAAGCTGC	pRNAT U6.3, ApaI, 2294 bp
km-017_s	CTGTGCCTTCTAAATAGATATCAATTACGGGGTC	pRNAT U6.3, EcoRV, 936 bp
km-017_as	GACCCCGTAATTGATATCTATTTAGAAGGCACAG	pRNAT U6.3, EcoRV, 936 bp
km-018_s	CCTGATTCTGTGGATATCCGTATTACGCCATGC	pEYFP-C2, EcoRV, 4712 bp
km-018_as	GCATGGCGGTAATACGGATATCCACAGAATCAGG	pEYFP-C2, EcoRV, 4712 bp

2.1.7 Antikörper

Zur Detektion von Proteinen in biochemischen Anwendungen wie z.B. im Western Blot (WB) und in Immunfluoreszenzen (IF) wurden die in Tabelle 2.5 angegebenen Antikörper eingesetzt.

Tab. 2.5: Übersicht der eingesetzten primären Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
2H11 Anti-hPFN1	Maus	Sabine Buchmeier (AG Jockusch)	1:2 (IF)
2C5 Anti-PFN1	Maus	Sabine Buchmeier (AG Jockusch)	1:10 (WB), Unverdünnt (IF)
1A11Anti-PFN1	Maus	Sabine Buchmeier (AG Jockusch)	1:50 (WB), 1:10 (IF)
4H5 Anti-PFN2a	Maus	Sabine Buchmeier (AG Jockusch)	1:10 (WB), 1:75 (IF)
4A6 Anti-Birkenprofilin	Maus	Sabine Buchmeier (AG Jockusch)	1:5000 (WB, als Miniperm-Überstand)
Antiserum #361 Anti-PFN2a	Kaninchen	Katrin Schlüter (AG Jockusch)	1:20000 (ELISA), 1:10000 (WB), 1:100 (IF)
2G2 Anti-G-Aktin	Maus	Sabine Buchmeier (AG Jockusch)	1:2 (WB)
5G6 anti-Raver1	Maus	Sabine Buchmeier (AG Jockusch)	Fluorochromierung mittels Zenon-Technik
Buss-Serum Anti-PFN1	Kaninchen	Folma Buss (AG Jockusch)	1:1000 (ELISA)
DM1α Anti-Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	WB (1:10000)
Anti-Mena	Maus	Transduction Laboratories (Lexington, USA)	WB (1:100)
hVin1 Anti-Vinculin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	1:1200 (IF, WB)
Anti-Synapsin 1 & 2	Kaninchen	Synaptic Systems (Göttingen)	1:1000 (WB), 1:100 (IF)
Anti-Dynamin 1	Kaninchen	Synaptic Systems (Göttingen)	1:1000 (WB), 1:100 (IF)
Anti-MAP2	Kaninchen	DCS (Hamburg)	1:1000 (IF)
Anti-GFAP	Kaninchen	DakoCytomation (Hamburg)	1: 500 (IF)
Anti-VGAT	Kaninchen	Synaptic Systems (Göttingen)	1:250 (IF)
3B11 Anti-Gephyrin	Maus	Sabine Buchmeier (AG Jockusch)	1:100 (WB), 1:25 (IF)
Anti-GFP	Maus	Clontech (Heidelberg)	1:2000 (WB)
Anti-mHSP70	Maus	Dianova (Hamburg)	1:500 (IF)

Die eingesetzten Sekundär-Antikörper sowie bei Fluoreszenzfärbungen verwendeten Agenzien sind in Tabelle 2.6 angegeben.

Tab. 2.6: Übersicht der eingesetzten Sekundär-Antikörper und Reagenzien

Antikörper/ Agenz	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus IgG Cy3 (kreuzabsorbiert)	Ziege	Dianova (Hamburg)	1:100 (IF)
Anti-Maus IgG Cy2 (kreuzabsorbiert)	Ziege	Dianova (Hamburg)	1:100 (IF)
Anti-Kaninchen Cy3 (kreuzabsorbiert)	Ziege	Dianova (Hamburg)	1:100 (IF)
Anti-Kaninchen Cy2 (kreuzabsorbiert)	Ziege	Dianova (Hamburg)	1:100 (IF)
Anti-Kaninchen Cy5 (kreuzabsorbiert)	Ziege	Dianova (Hamburg)	1:100 (IF)
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	1:10000 (WB & ELISA)
Anti-Maus-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	1:10000 (WB)
Phalloidin-TRITC		Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	1:100 (IF)
Phalloidin-FITC		Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	1:100 (IF)
Phalloidin-Alexa647		Invitrogen (Karlsruhe)	1:100 (IF)
Phalloidin-Alexa546		Invitrogen (Karlsruhe)	1:100 (IF)
DAPI		Appllichem (Darmstadt)	1:1000 (IF)

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* – Kulturen erfolgte in 3 ml 2x YT-Medium bei 220 rpm und 37°C über Nacht, wozu von Einzelkolonien ausgegangen wurde. Größere Kulturen wurden im Verhältnis 1:50 angeimpft und bei 37°C sowie 220 rpm kultiviert.

Stammplatten wurden durch die Zugabe von 15 g/l Agar zum Medium hergestellt. Die zu kultivierenden Bakterien wurden in einem Suspensionsvolumen von 100 µl ausplattiert. Je nach verwendetem Vektor wurde zur Selektion auf rekombinante Klone 50 µg/ml Kanamycin bzw. 150 µg/ml Ampicillin oder 200 µg/ml Spectinomycin in das Medium gegeben.

2x YT-Medium: 10 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Pepton

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Herstellung kompetenter *E.coli*

Um eine effektive Aufnahme von Plasmid-DNA zu ermöglichen, wurden die verwendeten *E. coli* vor der Transformation mit eiskalter Calciumchlorid-Lösung behandelt, welche zu Veränderung der bakteriellen Membran führt. Zu Beginn wurden 100 ml LB-Medium im Verhältnis 1:50 mit einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 30°C und 220 rpm bis zum Erreichen der frühen logarithmischen Wachstumsphase, in der die Bakterienkultur eine optische Dichte von ungefähr 0,5 bei 600 nm erreicht hatte. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt: Die Kultur wurde anschließend für 5 Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert; wonach das Bakterienpellet in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min inkubiert wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 2,5 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für mindestens weitere 10 Minuten inkubiert. Zur Lagerung der kompetenten Zellen bei -80°C wurde der Bakteriensuspension Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15% zugefügt. Gelagert wurde die Bakteriensuspension in 200 µl Aliquots für den einmaligen Gebrauch.

Luria Bertani (LB)-Medium: 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt

2.3.2 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Pro Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µg Plasmid-DNA vermischt und für 30 Minuten auf Eis gehalten. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden, wonach die Suspension für weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert wurde. Um die Expression der Antibiotika-Resistenzgenen zu ermöglichen, wurde die Bakteriensuspension mit 500 µl antibiotikafreie LB-Medium versetzt und 30 Minuten (Ampicillin-Resistenz) bzw. eine Stunde (Kanamycin-Resistenz) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Vor dem Ausplattieren wurde die Suspension für drei Minuten bei 5000 rpm (Tischzentrifuge 113, Sigma) zentrifugiert, der Überstand dekantiert, die Bakterien in 100 µl Medium resuspendiert und ausplattiert. Inkubiert wurden die Platten über Nacht bei 37°C.

2.3.3 Präparation von DNA aus Bakterien durch Alkalische Lyse

3 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden für 5 Minuten bei 6000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus) zentrifugiert und anschließend in 300 µl P1/RNase resuspendiert. Lysiert wurden die Bakterien über die Zugabe von 300 µl P2, wodurch Proteine und genomische DNA denaturiert werden. Die Neutralisation wurde durch die Zugabe von 300 µl P3 erreicht.

Zur Entfernung von Zelltrümmer, gefällter Proteine und genomischer DNA wurde zweimal bei 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, wonach anschließend durch die Zugabe von 620 µl Isopropanol Plasmid-DNA ausgefällt wurde. Diese wurde durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 Minuten sedimentiert, durch die Zugabe von 70% Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und abschließend in 50 µl 20 mM Tris-HCl pH 7,4 aufgenommen. Plasmide zur Transfektion eukaryontischer Zellen wurden nach Herstellerprotokoll (Plasmid Midi Protokoll) mit dem „Qiagen Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

P1: 6,06 g/l Tris, 3,72 g/l Na₂EDTA·2 H₂O, 100 mg/l RNase A, pH 8,0

P2: 8 g/l NaOH, 50 ml/l 20 % SDS

P3: 294,5 g/l Kaliumacetat pH 5,5 (110 ml Eisessig)

2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm kann die Konzentration sowie die Reinheit von DNA bestimmt werden. Eine Absorption von 1 bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter entspricht einer Menge von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA wird durch den Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm ermittelt: Reine DNA besitzt einen Quotienten OD₂₆₀ / OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen durch Proteine hin.

2.3.5 DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonucleasen

Die verwendeten Restriktionsendonucleasen wurden dazu eingesetzt, an spezifischen Sequenzen Phosphodiester-Bindungen zu lösen. Bei einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurden zwei Mikrogramm DNA und zwei Unit Restriktionsendonuclease eingesetzt. Zu den Restriktionsendonucleasen wurde 1 µl des empfohlenen 10x Reaktionspuffers sowie BSA zugesetzt.

2.3.6 DNA-Gelelektrophorese

DNA kann im elektrischen Feld unter Verwendung eines Agarose-Gels der Größe nach aufgetrennt werden. In Abhängigkeit der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarose-Gele mit Konzentrationen zwischen 0,8 - 2% in TBE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit einer konstanten Spannung von 100V. Nachgewiesen wurden DNA-Fragmente im Gel durch den Zusatz von Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert.

5x TBE-Puffer: 54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8; auf 1000 ml mit H₂O_{dest.} aufgefüllt

4x DNA-Ladepuffer: 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerin in 5x TBE-Puffer

Längenmarker: 100 bp Leiter der Firma Fermentas

2.3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das „QIA[®]EXII Gel Extraction Kit“ (Qiagen) genutzt. Die negativ geladene DNA bindet an Glaspulver und kann anschließend eluiert werden. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

2.3.8 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Herstellung doppelsträngiger DNA wurden die komplementären synthetischen DNA-Strängen in einem PCR-Thermocycler auf 94°C erhitzt und anschließend schrittweise auf 4°C abgekühlt. Der Temperaturverlauf ist dem Anhang zu entnehmen.

10x Annealing-Puffer: 200 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl

2.3.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten per Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP)

Mithilfe der Shrimp Alkalischen Phosphatase (SAP, Boehringer Ingelheim) können spezifisch die 5'-Phosphat-Reste von DNA-Fragmenten entfernt werden. Im Falle von Subklonierungen kann somit verhindert werden, dass hydrolysierte Zielvektoren ohne Insertion eines Fragmentes re-ligieren. Ausgehend von einem Restriktionsansatz wie in Kapitel 2.3.5 wird das Volumen auf 40 µl erhöht. Enthalten sind in diesem Ansatz 4 µl 10x SAP-Puffer sowie zehn Unit der Alkalischen Phosphatase. Bei DNA-Fragmenten mit Überhängen erfolgt die Dephosphorylierung für 30 Minuten bei 37°C; DNA-Fragmente mit glatten Enden werden analog für Stunde bei 37°C inkubiert. Abschließend wird die SAP für zehn Minuten bei 65°C inaktiviert.

2.3.10 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels T4-Polynukleotid-Kinase

Durch die Verwendung der T4-Polynukleotid-Kinase (NEB) können Phosphat-Reste an 5'-Ende an synthetisch hergestellte Nukleotide transferiert werden. 300 pmol der zu phosphorylierenden DNA-Fragmente werden in einem 50 µl Reaktionsansatz mit 10 Units der T4-Polynukleotid-Kinase und 5 µl 10fach-Reaktionspuffer versetzt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Abschließend wurde die T4-Polynukleotid-Kinase für 20 Minuten bei 65°C inaktiviert.

2.3.11 DNA-Ligation

Die Verwendung der T4-DNA-Ligase ermöglicht die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen benachbarten 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden, was zur Neukombination von DNA-Fragmenten genutzt wird. Das Reaktionsvolumen für eine Ligation betrug 10 µl, in dem Insert und 100-500 ng

Vektor im molaren Verhältnis 3:1 eingesetzt wurden. Außerdem enthalten sind 1 µl 10x Ligationpuffer und ein Unit T4-DNA-Ligase (NEB). Die Reaktionsdauer betrug bei Raumtemperatur zwei Stunden; bei 16°C wurde über Nacht inkubiert.

2.3.12 Ortsgerichtete Mutagenese

Gemäß des QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene wurden auf der Basis der Konstrukte pET21c(+)-mPFN2a/h und pEYFP-C2-mPFN2a mod durch Basenaustausch Mutationen in cDNAs eingeführt.

Die Grundlage für die Mutagenese bildet ein doppelsträngiger Vektor (10 ng) sowie zwei Oligodesoxynukleotide (je 60 ng), die die mutierten Sequenzen beinhalten. An die komplementären Sequenzen gebunden erfolgt von den Primern ausgehend per PCR die Elongation durch die Pfu-Turbo-Polymerase (1,5 U). Im Anschluss wird eine Inkubation mit der Restriktionendonuclease *DpnI* (6 U) für eine Stunde bei 37°C durchgeführt. *DpnI* hydrolysiert ausschließlich methylierte DNA.

Dadurch wird nur die "template DNA" degradiert, während die per PCR neu-synthetisierte DNA erhalten bleibt. Diese wird anschließend für eine Transformation von kompetenten *E. coli* des Stamms XL1-Blue (siehe Kapitel 2.3.2) verwendet. Abschließend erfolgt die Isolierung der erstellten DNA aus rekombinanten Klonen (Kapitel 2.3.3.), wobei die eingeführten Mutationen durch DNA-Sequenzierung (Kapitel 2.3.14) verifiziert werden.

2.3.13 DNA-Sequenzierung

Zur nichtradioaktiven DNA-Sequenzierung wurde das *AmpliTaq® FS BigDye Terminator Kit* der Firma PE AppliedBiosystems genutzt, das auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger et al., 1977) basiert. An einen zu sequenzierenden DNA-Strang bindet als Startpunkt ein spezifischer Primer, von dessen 3'-OH-Gruppe durch eine DNA-Polymerase in einer Polymerase-Kettenreaktion der komplementäre Strang mit Fluorochrom markierten Didesoxynukleotiden synthetisiert wird. Aufgrund der Verwendung von Didesoxynukleotiden wird die Synthese des Strangs basenspezifisch beendet. Für die Sequenzreaktion wurden 5 pmol Sequenzprimer (siehe Kapitel 2.1.4.), 0,75 µg doppelsträngige DNA und 2 µl Premix (BigDye, PE AppliedBiosystems) eingesetzt. Zur Reduktion von Hintergrundsignalen wurde nach der Sequenzreaktion die DNA durch eine Natriumacetat-Ethanol-Fällung gereinigt. Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und durch die Inkubation mit 12,5 µl Template Supression Reagent (PE AppliedBiosystems) bei 90°C für 2 Minuten denaturiert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Proteinbestimmung wurde meistens die Methode nach Bradford (1976) verwendet, die auf der Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie Brilliantblue G250 mit Proteinen basiert, und durch eine photometrische Messung der Absorption bei 595 nm analysiert werden kann. Genutzt wird hierbei, dass die Bildung des Farbkomplexes proportional zu einer Proteinmenge im Bereich von 50-150 µg/µl ist. Diese Methode ist dabei relativ unempfindlich gegenüber Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (DTT) oder β-Mercaptoethanol. 20 µl einer Proteinelösung wurden in eine 96 well-Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorb) gegeben und mit 100 µl Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich) versetzt und nach 10 Minuten in einem ELISA-Reader gemessen. Bestimmt wurde die Proteinkonzentration anhand einer Eichgerade, die auf BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 25-200 µg basierte.

2.4.2 Proteinbestimmung über das Lambert-Beersche-Gesetz

Aufgrund aromatischer Gruppen lassen sich die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin in Proteinen durch photometrische Messungen der Absorption bei 280 nm nachweisen. Die Konzentration gereinigter Proteine kann somit über das Lambert-Beersche-Gesetz bestimmt werden.

$$E = e \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion, e = molarer Extinktionskoeffizient
c = Konzentration, d = Schichtdicke der Küvette

Molare Extinktionskoeffizienten der Isoformen Profilin 1 und Profilin 2a:

Profilin 1: 0,83 mg/ml bzw. 56 µM pro 1 OD₂₈₀ (Larsson & Lindberg, 1988)

Profilin 2a: 0,71 mg/ml bzw. 47 µM pro 1 OD₂₈₀ (Schlüter, 1996)

Diese Methode ist präziser als die Proteinbestimmung nach Bradford; jedoch interferieren bei der Messung bereits geringe Mengen an Reduktionsmitteln wie beta-Mercaptoethanol und DTT.

2.4.3 Konzentrieren von Proteinen

Unter Verwendung von Amicon-Centricon-Röhrchen (Amicon, Schwalbach) wurden Proteine durch die Zentrifugation durch semipermeable Membranen mit einem molekularen Ausschlussvolumen (molecular weight cut off – MWCO) von 5000 kDa entsprechend der Herstellerangaben.

2.4.4 Umpuffern von Proteinen

Gereinigtes Profilin wurde mittels Dialyse umpuffert. Eingesetzt wurden Spectra-Por-Dialyseschläuche (Roth, Karlsruhe) mit einem MWCO von 5000 kDa. In Abhängigkeit des Probenvolumens wurde 2-5mal gegen 0,5 bis 2 Liter Puffer dialysiert.

2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können in Abhängigkeit des Molekulargewichts unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) maskiert die Eigenladung von Proteinen und ermöglicht eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine in Relation zum Molekulargewicht.

Die Wanderungsgeschwindigkeit unterschiedlich großer Proteine wird durch die Porengröße einer Polyacrylamidmatrix bestimmt. Polyacrylamid-Gele bestehen aus einem Sammelgel, durch das die aufzutrennenden Proteine fokussiert werden, und einem Trenngel, in dem die Auftrennung gemäß dem Molekulargewicht der Proteine erfolgt. Zur Analyse von Profilin wurden SDS-Gele eingesetzt, deren Trenngele eine Polyacrylamid-Konzentration von 13,75% aufwiesen. Vor dem Auftrag wurden die Proteinproben mit dem entsprechenden Volumen des 4x SDS-Ladepuffers versetzt und anschließend bei 95°C für fünf Minuten aufgekocht. Während die Proteine sich im Sammelgel befanden, betrug die Spannung konstant 80 Volt. Im Trenngel wurde eine Spannung von 120 Volt angelegt.

Als Größenstandard diente der „prestained protein weight marker“ von NEB bzw. „low molecular weight protein marker“ von Sigma, deren Zusammensetzung in den Tabellen 2.7 & 2.8 aufgeführt ist.

Tab. 2.7: prestained protein weight marker, NEB

Protein	Quelle	Molekulargewicht (kDa)
MBP- β -Galactosidase	<i>E. coli</i>	175
MBP-Paramyosin	<i>E. coli</i>	83
Glutamat-Dehydrogenase	Rinderleber	62
Aldolase	Kaninchenmuskel	47,5
Triosephosphat Isomerase	Kaninchenmuskel	32,5
β -Lactoglobulin A	Rindermilch	25
Lysozyme	Hühnereiweiss	16,5
Aprotinin	Rinderlunge	6,5

Tab. 2.8: Low molecular weight protein marker, Sigma

Protein	Quelle	Molekulargewicht (kDa)
Serum-Albumin	Rind	66
Albumin	Hühnereiweiß	45
Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)	Kaninchenmuskel	36
Carbon-Anhydrase	Rind	29
Trypsinogen	Rinder-Pankreas	24
Trypsin-Inhibitor	Sojabohne	20
<i>α</i> -Lactalbumin	Rindermilch	14

Nach erfolgter Auftrennung wurden die im Gel enthaltenen Proteine für weitere Analysen direkt durch den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue angefärbt oder per Semidry-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Für die Coomassie-Färbung wurden die Gele aufgekocht und für eine Stunde in einer Färbelösung unter Schwenken gefärbt. Anschließend wurde mit Entfärber überschüssiges Coomassie entfernt.

SDS-PAGE-Acrylamid-Lösung: 30% Acrylamid, 0,8% Bis-(N,N'-Methylen)diacrylamid)

SDS-PAGE-Trenngellösung: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,4% SDS

SDS-PAGE-Sammelgellösung: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,4% SDS

4 x SDS-PAGE-Probenpuffer: 0,38 M Tris/HCl, pH 6,8, 2% SDS, 12% Glycerin (87%), 0,05% Bromphenolblau

SDS-PAGE-Elektrophorese-Puffer: 0,05 M Tris/HCl, pH 8,7, 0,1% SDS, 0,4 M Glycin

Coomassie-Färbelösung: 12,5% (w/v) Eisessig, 25% (v/v) Isopropanol, 0,05% (w/v) Coomassie-Blue

Proteingel-Entfärbepuffer: 19% (v/v) Eisessig, 12,5% (w/v) Isopropanol

2.4.6 Western Blot

Per Western Blot können durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine immobilisiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Zu Beginn wurde ein Transfer der im Gel befindlichen Proteine nach dem Semidry-Blot Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (Biometra) durchgeführt: Nachdem die Gele in Blotpuffer äquilibriert wurden, wurde die Blotkammer gemäß der Herstellerangaben (Biometra) aufgebaut. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für eine Dauer von 1,5 Stunden bei einer Stromstärke von 2-3 mA/cm², was 100 mA pro Gel entsprach. Der Erfolg des Transfers wurde durch eine Färbung der immobilisierten Proteine mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau S überprüft. Vor dem Nachweis spezifischer Proteine durch Antikörper wurden freie Bindestellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation mit 5% Milchpulver in 1x TBST abgesättigt. Nach mehrmaligem Waschen mit 1x TBST erfolgte die Inkubation der Membran mit einer Primärantikörper-Lösung für zwei Stunden. Ungebundene Primärantikörper wurden durch Waschen mit 1x TBST entfernt. Anschließend wurde die Membran mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppeltem Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert.

Nach mehrmaligem Waschen mit 1x TBST und abschließend mit 1x TBS-X wurde eine „Enhanced chemoluminescence (ECL)“-Entwicklung durchgeführt. Bei der ECL-Entwicklung erfolgt die Detektion der HRP gekoppelten Antikörper durch die enzymatische Umsetzung des Substrats Luminol, wodurch lokal Licht emittiert wird, das mittels eines Röntgenfilms nachgewiesen wurde (Amersham, Freiburg)

1 x Semi-dry-Blot-Puffer: 25 mM Tris/HCl; pH 8,5, 150 mM Glycin, 10% Methanol

1 x TBST: 0,02 M Tris/HCl, pH 7,6; 0,14 M NaCl, 0,1% Tween 20

1x TBS-X: 1x TBST + 1% Triton-X 100

2.4.7 Denaturierende Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure

Durch die Zugabe konzentrierter Trichloressigsäure mit einem Anteil von 10 bis 20% des Gesamtvolumens können Proteine aus Lösungen präzipitiert werden. Nach Zugabe von Trichloressigsäure wurden die Lösungen für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 Minuten (Tischzentrifuge Sigma 113). Die sedimentierten Proteine wurden abschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Noch vorhandene Reste an Trichloressigsäure wurden durch Zugabe geringer Mengen an SDS-Trenngel-puffer neutralisiert.

2.4.8 Expression und Reinigung von rekombinantem Profilin 2a über Poly-Prolin-Affinitätschromatographie

Die Basis der Reinigung von Profilin bildet eine Affinitätschromatographie mit Poly-Prolin (Tanaka & Shibata, 1985): Zur Expression wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) mit pET-Vektoren (Novagen) transformiert, die als Insert cDNA-Fragmente von PFN 2a bzw. dessen Mutanten beinhalten. *E. coli* wurden in 1 Liter-Kulturen bei 37°C und 220 rpm in 2x YT Medium mit 150 µg/ml Ampicillin angezogen. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 bei 600 nm wurde in den Bakterien die Profilin-Expression durch 1 mM IPTG induziert. Nach einer weiteren Inkubationsdauer von vier Stunden wurden die Bakterien durch Zentrifugation (6000 rpm im JA10 Rotor, 15 Minuten, 4°C) sedimentiert, in 25 ml Lysis-puffer aufgenommen und für 20 Minuten auf Eis mit 1 mg/ml Lysozym inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakteriensuspensionen bei – 80°C eingefroren. Der Zellaufschluss der aufgetauten Suspensionen erfolgte mittels Ultraschallbehandlung. Größere Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (14000 rpm im JA17 Rotor, für 15 Minuten, 4°C) entfernt. Das klare Lysat wurde auf eine Poly-L-Prolin-Säule (30 ml Säulenvolumen) mit einer Fließgeschwindigkeit von zirka 30 ml/h aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch den Durchfluss von insgesamt 300 ml Waschpuffer sowie 50 ml 2 M Harnstoff haltigem Elutionspuffer I vom Säulenmaterial entfernt. Die Elution von Profilin wurde durch die Zugabe von Harnstoff erreicht, der zur Denaturierung des Proteins führt. Profilin 2a kann aufgrund hoher Affinität zu Poly-Prolin nur mit 8 M Harnstoff eluiert werden (Lambrechts et al., 1995). Proteinhaltige Fraktionen wurden durch das Auftropfen auf eine Nitrocellulosemembran und anschließende Ponceau-Färbung identifiziert.

Die Profilin haltigen Fraktionen wurden durch eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung identifiziert. Die reinen Profilin haltigen Fraktionen wurden vereinigt und in mehreren Stufen dialysiert. Aufgrund der Elution mit 8 M Harnstoff wurde Profilin 2a zunächst mit 4M und anschließend in 2M Harnstoff haltigen Dialysepuffer dialysiert. Zur Vermeidung einer irreversiblen Denaturierung wurde dem Dialysepuffer 5 mM DTT zugesetzt. Das während der Dialyse gebildete Präzipitat wurde durch Filtration (0,2 µm Filter) und anschließende Zentrifugation (40000 x g, 90 Minuten, 4°C) entfernt. Die Poly-Prolin-Säule wurde nach intensivem Waschen mit Elutionspuffer II (PFN 2) mit 5-10 Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert.

Lysis-Puffer:

30 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100, Proteaseinhibitoren (1:1000 verdünnt): AEBSF, Pepstatin A, Trasylol.

Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl

Elutionspuffer I: Waschpuffer, 2 M Harnstoff

Elutionspuffer II (PFN 2): Waschpuffer, 8 M Harnstoff

Dialyse Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM CaCl₂, 5 mM DTT

Lysozym (isoliert aus Hühnereiern, 138000 U/mg, kristallin), Serva (Heidelberg)

2.4.9 Reinigung von genuinem Profilin 1 und 2a

Die Generierung von monoklonalen Antikörpern erfordert Antigene zur Immunisierung von Versuchstieren und zur Selektion Antikörper produzierender Hybridoma-Klone. Hierfür wurde anstelle rekombinanter Profiline genuines Rinder-Profilin 2 aus Rinderhirn bzw. Maus-Profilin 1 aus Milz und Leber gereinigt. Die Methode zur Reinigung genuiner Profiline basiert auf der zuvor beschriebenen Poly-Prolin-Affinitätschromatographie; erfordert jedoch weitere Reinigungsschritte, um genuines Profilin in hoher Reinheit zu erhalten. Im Falle der Reinigung von Rinder-Profilin 2a ist zudem eine Separierung von co-exprimierten Rinder-Profilin 1 erforderlich. Sowohl Rinderhirn als auch Mäuse-Milz bzw. Lebern werden im doppelten Volumen des bPFN-Extraktionspuffers aufgenommen und anschließend per Mixer (Blender) homogenisiert. Dieses Homogenat wurde bei 40000 x g für eine Stunde im JA14 zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in einer Ultrazentrifuge bei 120000 x g (Rotor Ti45) für 90 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde nachfolgend mit einer Fließgeschwindigkeit von 40 ml/h auf eine in Extraktionspuffer äquilibrierten Poly-Prolin-Säule (Säulenvolumen 30 ml) aufgetragen. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Proteinen wurde die Säule mit mindestens 10 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Insbesondere zur Entfernung von G-Aktin wurde die Poly-Prolin-Säule mit 2M Harnstoff haltigen Elutionspuffer I gewaschen. Für die Reinigung von Profilin 2a aus Rinderhirn folgte nacheinander der Auftrag von Elutionspuffer für jeweils 2 Stunden mit 4 M, und 6 M Harnstoff, um gezielt co-exprimiertes Rinder-Profilin 1 von der Säule zu entfernen. Nach einer weitestgehenden Elution von Rinder-Profilin 1 wurde das mit höherer Affinität bindende Rinder-Profilin 2 mittels 8 M Harnstoff haltigem Elutionspuffer eluiert. Profilin 2 haltige Fraktionen wurden im Dot Blot über das anti-Profilin 2 Serum #361 identifiziert, wobei mit Profilin 1 kontaminierte Proben anhand des Rinder-Profilin 1 spezifischen Antikörpers 2h11 erkannt werden konnten. Im Falle der Reinigung von Maus-Profilin 1 war kein Harnstoff-Gradient notwendig, da keine andere Profilin-

Isoform mit Profilin 1 in Milz und Leber der Maus co-exprimiert wird. Profilin 1 wurde daher direkt mit 6 M Harnstoff haltigem Elutionspuffern erhalten. Die Profilin haltigen Fraktionen nach der Poly-Prolin-Affinitätsreinigung waren generell mit weiteren Proteinen, vor allem G-Aktin, verunreinigt. Zur Beseitigung dieser Verunreinigungen kann entweder eine Gelfiltration mit einer Superdex 200-Säule oder eine Anionen-Austauscherchromatographie mittels MonoQ-Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Für die effizientere Anionen-Austauscherchromatographie wurden die Profilin-Fraktionen in den Puffer A umdialysiert. Unter diesen Ionenbedingungen bindet vor allem G-Aktin sowie die meisten verunreinigenden Proteine an die MonoQ-Säule, während Profilin die Säule passiert. Gebundenes Aktin wurde mit 1 M KCl in Puffer A eluiert.

bPFN-Extraktionspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5mM EGTA, 1mM DTT, Proteaseinhibitoren (1:1000 verdünnt): AEBSF, Pepstatin A, Trasylol.

Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl pH7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM ATP)

Elutionspuffer: Waschpuffer mit 2M, 4M, 6 M bzw. 8 M Harnstoff

Puffer A: 25 mM Tris-HCl pH7,6, 0,5 mM DTT, 0,1 mM ATP, 2,1 M Harnstoff

2.4.10 Reinigung von Profilin 2 mittels IMPACT-CN-System (NEB)

Das Impact-CN-System (NEB) nimmt unter den verfügbaren bakteriellen Expressionssystemen eine Sonderstellung ein. Rekombinante Proteine, die über dieses System exprimiert werden, sind mit einem sogenannten Intein-tag versehen, durch dessen Bindung an eine Chitin-Matrix eine effiziente Reinigung möglich ist. Im Gegensatz zu anderen Expressionssystemen auf der Basis von GST- oder His-Tags kann das Intein-tag, das unter Umständen inhibierend in biochemischen Experimenten wirken könnte, durch Zugabe von Reduktionsmitteln, Temperatur- und/oder pH-Erhöhung autoproteolytisch abgespalten werden.

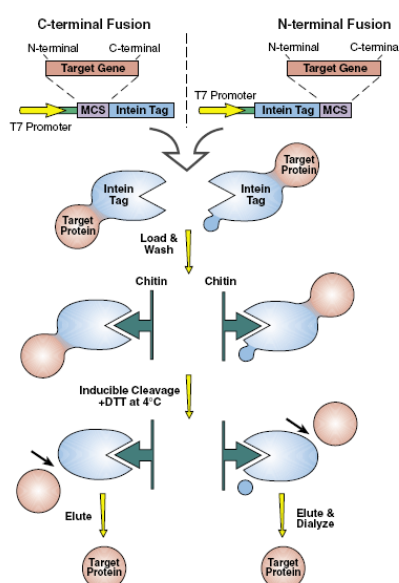


Abb. 2.1: Schematische Illustration des Funktionsprinzips des IMPACT-CN-Systems (übernommen aus dem IMPACT-CN Instruction Manual (NEB))

Die Expression von Intein-Profilin 2a-Fusionsproteinen erfolgte in pTYB12 (NEB) transformierten *E. coli* des Stammes ER2566. Die *E. coli* wurden in 1 Liter-Kulturen bei 37°C und 220 rpm in 2x YT Medium mit 150 µg/ml Ampicillin angezogen. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von 0,7 bei 600 nm wurde in den Bakterien die Profilin-Expression durch 0,5 mM IPTG induziert. Nach einer Inkubation bei 18°C über Nacht wurden die Bakterien durch Zentrifugation (6000 rpm im JA10 Rotor, 15 Minuten, 4°C) sedimentiert, in 25 ml Intein-Bindungspuffer (mit Protease-Inhibitoren) aufgenommen und anschließend bei – 80°C eingefroren.

Der Zellaufschluss erfolgte mittels French Press bei 1000 psi und anschließende Ultraschallbehandlung. Nachfolgend wurden Zelltrümmer per Zentrifugation beseitigt (14000 rpm im JA17 Rotor, 45 Minuten, 4°C) und das klare Lysat auf eine mit Intein-Bindungspuffer äquilibrierten Chitin-Matrix aufgetragen. Die in einer Säule befindliche Chitin-Matrix wurde nach Auftrag des Bakterienlysates mit 20 Säulenvolumen Intein-Bindungspuffer gewaschen. Die Autoproteolyse des Inteinprofilins wurde durch eine rasche Äquilibration des Säulenmaterials mit Intein-Spaltungspuffer induziert. Die Elution des gespaltenen Profilins erfolgte nach einer 40 stündigen Inkubation der Chitin-Matrix mit Intein-Spaltungspuffer. Die Profilin haltigen Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit überprüft, vereinigt und ankonzentriert.

Chitin-Bindungspuffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl

Chitin-Spaltungspuffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,5, 300 mM NaCl, 50 mM DTT

2.4.11 Analyse der Poly-Prolin-Bindung von Profilin 2a durch Präzipitation mittels Poly-Prolin-Sepharose

Für qualitative Bestimmung der Poly-Prolin-Bindung von Profilin 2a und dessen Mutanten kann eine Präzipitation rekombinanter Proteine mit der in den Kapiteln 2.4.8 & 2.4.9 beschriebene Poly-Prolin-Sepharose durchgeführt werden. Profileine, die über eine ausreichend hohe Affinität verfügen, binden an die Poly-Prolin-Sepharose und können mittels Zentrifugation isoliert werden. Proteine ohne Affinität zu Poly-Prolin-Motiven hingegen verbleiben im Überstand. Je 10 µg des gereinigten mPFN2a und der Mutante mPFN2a Y29,133S wurden in einem Volumen von 150 µl PFN-Dialyse-Puffer mit 30 µl Poly-Prolin-Sepharose für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Poly-Prolin-Sepharose bei 1000 g sedimentiert, der Überstand abgenommen, mindestens fünfmal mit PFN-Dialyse-Puffer gewaschen und abschließend in SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden per TCA-Fällung präzipitiert und ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen und aufgeköcht. Die Analyse der Fraktionen über den Verbleib der eingesetzten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE.

2.4.12 Quantitative Analyse der Poly-Prolin-Bindung von Profilin 2a durch spektral-fluorimetrische Messung der Tryptophan-Fluoreszenz

Im Gegensatz zu der Präzipitation von Profilin mit Poly-Prolin-Sepharose ermöglicht eine Messung der intrinsischen Fluoreszenz von Profilin eine quantitative Bestimmung der Bindungsaffinität zu Poly-Prolin. Diese Messmethode beruht vor allem auf der Veränderung der Eigenfluoreszenz der aromatischen Aminosäure Tryptophan und in geringerem Maße der Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin. Fluoreszenzänderungen dieser Aminosäuren in gefalteten Proteinen können durch Ligandeninteraktion bedingte Konformationsänderungen hervorgerufen werden, da dies zu veränderten Expositionen der Aminosäuren zum polaren Lösungsmittel führen kann.

Für Profilin 1 wurde beschrieben, dass eine Interaktion mit gelöstem Poly-Prolin eine 2,2fache Erhöhung sowohl der Tryptophan als auch der Tyrosin-Fluoreszenz zur Folge hat (Perelroizen et al., 1995). Zur quantitativen Bestimmung der Poly-Prolin-Bindung von Profilin 2a wurden 10 μM mPFN2a bzw. mPFN2a Y29,133S (gelöst in PFN-Dialysepuffer mit 1 mM DTT) in einem Reaktionsvolumen von 500 μl mit steigenden Mengen an gelöstem Poly-Prolin versetzt und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde in einem Spektralfluorimeter (Perkin-Elmer LB50) bei 330 nm die Emission der Tryptophanfluoreszenz gemessen. Die spezifische Anregung der Tryptophane erfolgte bei einer Wellenlänge von 295 nm. Die Fluoreszenzänderung wurde anhand der Subtraktion der Ausgangsfluoreszenz des Profilins ohne Poly-Prolin berechnet und relativ zu den jeweiligen Poly-Prolin-Konzentrationen aufgetragen. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Software Graphpad Prism 4.0 (Statcon, Witzenhausen).

PFN-Dialysepuffer mit 1 mM DTT

2.4.13 Quantitative Analyse der G-Aktin-Bindung von Profilin 2a durch „non-steady“ Aktin-Polymerisation mit Pyren-Aktin

Der Einfluss Aktin-assoziiierter Proteine auf die Polymerisation von Aktin kann *in vitro* mit gereinigten Proteinen verfolgt werden. Hierfür kann markiertes G-Aktin, so genanntes Pyren-Aktin, verwendet werden, dessen Fluoreszenz durch den Einbau in Aktin-Filamente um den Faktor 25 ansteigt (Kouyama & Mihashi, 1981). Eine schnelle und Ressourcen sparende Variante dieses Experimentes ist der „non steady state“-Aktin-Polymerisation assay, in dem in Echtzeit die Aktin-Polymerisation über Fluoreszenzänderungen analysiert werden kann. Für die Analyse der Profilin-Aktin- Interaktion wurden 5 μM G-Aktin mit einem Pyren-Aktin-Gehalt von 5% mit 15 μM Profilin in einem Reaktionsvolumen von 450 μl in 2x G-Aktin-Puffer für 10 Minuten bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden 50 μl des 10x Magnesium-Substitution-Puffers hinzugegeben, und es erfolgte eine weitere Inkubation der Lösung für 2 Minuten bei 20°C. Die Aktin-Polymerisation wurde durch die Zugabe von 50 μl des 10x Polymerisationspuffers ausgelöst und im Spektralfluorimeter bei einer

Anregung von 365 nm und Emissionswellenlänge bei 407 nm gemessen. Die Aktin-Polymerisation wurde für insgesamt 2 h verfolgt.

2x G-Aktin-Puffer: 2 mM Tris-HCl pH 7,5, 0, 2 mM ATP, 0,1 mM CaCl₂, 0,5 mM DTT

10x Magnesium-Substitution-Puffer: 50 µM MgCl₂, 0,2 mM EGTA

10x Polymerisation-Puffer: 500 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 100 mM Imidazol pH 7

2.4.14 Herstellung von Zell- und Gewebe-Extrakten

Für die biochemische Analyse von Gewebeextrakten wurde in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Gewebe im doppelten Volumen Hepes-Lysis-Puffer aufgenommen und mechanisch homogenisiert. Nach einer Zentrifugation bei 20000 x g wurde der Überstand abgenommen, die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt und weiter verwendet bzw. bei -80°C gelagert.

Kultivierte adhärente Zellen wurden wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben durch eine Trypsin/EDTA-Behandlung geerntet, zweimal mit 1x PBS gewaschen und nach abschließender Zentrifugation in Hepes-Lysis-Puffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgt durch dreimaliges Einfrieren in flüssigen Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37°C. Zelltrümmer wurden bei einer Zentrifugation bei 20000 x g entfernt. Analog zu Gewebeextrakten wurde die Proteinkonzentration nach Bradford ermittelt und weiter verwendet.

Hepes-Lysis-Puffer: 20 mM Hepes pH 7,2, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,05% Tween-20, 0,1% SDS und Protease-Inhibitoren (1:1000)

2.4.15 Affinitätschromatographie von Profilin-Liganden per Intein-Profilin 2a

Affinitätschromatographien, bei denen die zu untersuchenden Proteine im Überschuss auf einer Matrix immobilisiert vorliegen, stellen eine Möglichkeit dar, Protein-Protein-Interaktionen mit nativen Liganden zu untersuchen. Gewebe- oder Zellextrakte, in denen die natürlichen Liganden enthalten sind, werden mit dem Matrix-gebundenen Protein in Kontakt gebracht. Nach dem unspezifisch gebundenen Proteine durch intensives Waschen entfernt wurden, können die an die Matrix gebundenen Liganden identifiziert werden. Für die Affinitätschromatographie von Profilin-2a-Liganden aus Maushirn-Rohextrakt wurde das in Kapitel 2.4.10 aufgeführte IMPACT-CN-System verwendet. Im Gegensatz zu üblichen Chromatographie-Methoden wie mit Cyanobromid-aktivierter Sepharose ist das zu untersuchende Protein nicht kovalent an die Matrix gebunden. Intein-Profilin 2a wurde aus *E.coli* gereinigt, in dem es an eine Chitin-Matrix gebunden wurde. Parallel zu dieser Reinigung wurde partikelfreier Maushirn-Extrakt mit einer Chitin-Matrix vor-inkubiert, um an die Matrix unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wurde der Maushirn-Extrakt mit der Intein-Profilin 2a gesättigten Chitin-Matrix über Nacht inkubiert. Nach intensivem Waschen mit 30 Säulenvolumen Extraktionspuffer wurde die Säule in Chitin-Spaltungspuffer äquilibriert und analog zur Reinigung der Poly-Proilin-Mutante mPFN2a Y92,133S über 40 h inkubiert. Schließlich wurde das durch Autoproteolyse entstandene Profilin 2a und die spezifisch gebundenen Liganden mit mehreren Säulenvolumen Chitinspaltungspuffer von der Säule eluiert.

Die Elutionsfraktionen wurden gesammelt, per TCA-Fällung eingeeengt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot unter Verwendung von Profilin-Liganden spezifischen Antikörpern.

Hepes-Lysis-Puffer (ohne SDS): 20 mM Hepes pH 7,2, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.05% Tween-20, Protease-Inhibitoren (1:1000)

Hepes-Intein-Spaltungspuffer: 20 mM Hepes pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.05% Tween-20, 50 mM DTT

2.4.16 Dephosphorylierung von Proteinen mittels „calf intestine phosphatase“

Durch die Zugabe der „calf intestine phosphatase“ (CIP, NEB) können Phosphat-Gruppen von phosphorylierten Tyrosinen, Serinen und Threoninen von Proteinen entfernt werden. Hierfür werden die sedimentierten Zellen in den NEB-Puffer 3 mit Protease-Inhibitoren aufgenommen und, wie in Kapitel 2.4.13 beschrieben, lysiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden pro Mikrogramm Protein ein Unit CIP hinzugefügt, für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend für eine 2D Gel-Elektrophorese weiter verwendet.

2.4.17 2D-Gel-Elektrophorese von Proteinen

Bei der 2D-Gel-Elektrophorese erfolgte die erste Auftrennung der Proteine gemäß ihres isoelektrischen Punktes durch eine isoelektrische Fokussierung in einem Gelstreifen mit einem immobilisierten pH-Gradienten. Nach der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine in der zweiten Dimension unter denaturierenden Bedingungen anhand ihres Molekulargewichtes separiert. Im Gegensatz zur eindimensionalen SDS-PAGE erfordert diese Methode eine vorherige Entsalzung der zu analysierenden Proben. Das wie in Kapitel 2.4.14 beschriebenen gewonnene Zellmaterial wurde in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 aufgenommen. Zur Extraktion der Proteine ohne störende Salze wurde eine Phenolfällung bei einem pH-Wert von 7,4 vorgenommen, wobei ein zum Kaliumphosphat-Puffer äquivalentes Volumen an Phenol zugesetzt wurde. Nach 2 minütigem Vortexen wurden die Proben je für 10 Minuten erst bei 70°C und anschließend bei 0°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 1500x g und 4°C wurde die obere wässrige Phase verworfen und die präzipitierten Proteine mit reinst. Wasser versetzt. Analog zur Phenolbehandlung folgten zwei minütiges Vortexen und Inkubationen von 10 Minuten bei 70°C und 0°C mit anschließender Zentrifugation. Nach zweimaligem Waschen wurden 400 µl Aceton (-20°C) hinzugefügt und unter Schwenken bei 0°C für 10 Minuten inkubiert. Der Überstand an Aceton wurde nach einer Zentrifugation bei 1500 x g für 15 Minuten verworfen. Gemäß der ersten Zugabe wurden anschließend nochmals 600 µl Aceton hinzugefügt und wie beschrieben mit den Proben inkubiert. Anschließend wurde der Aceton-Überstand verworfen und die gefällten Proteine bei RT getrocknet. Im Anschluss wurden die Proben bei -80°C gelagert. Für die isoelektrische Fokussierung der Hühner-Profiline 1 und 2a wurden IEF-Gelstreifen (ReadyStrip) der Firma Bio-RAD (München) verwendet, in denen sich ein pH-Gradient von 3-10 über 7 cm erstreckt. Die Proben wurden in dem Rehydratisierungspuffer A resuspendiert und gemäß Bradford einer Proteinbestimmung unterzogen.

50 µg Gesamtprotein wurden in insgesamt 83,3 µl Rehydratisierungspuffer A aufgenommen und mit 41,7 µl Rehydratisierungspuffer B versetzt. Die in dem Rehydratisierungspuffer B enthaltenen Ampholyte sind gemäß des verwendeten pH-Gradienten zu wählen. Die in insgesamt 125 µl resuspendierte Probe wurde in die „Protean IEF-focusing“-Kammer (Bio-RAD, München) gefüllt. Anschließend wurde der IEF-Streifen mit dem Gel zu Probe weisend luftblasenfrei in die Kammer gelegt und anschließend mit Mineralöl überschichtet. Nach einer Inkubation über Nacht wurden die IEF-Streifen mit dem Gel zu den Elektroden zeigend in die IEF-Zelle eingelegt und mit 3 ml Mineralöl überschichtet. Die Spannung während der isoelektrische Fokussierung wird beginnend von 250 V graduell auf 4000 V erhöht und für 8000 Vh aufrechterhalten.

Für die Trennung der Proteine in der SDS-PAA-Gelelektrophorese wurden die IEF-Streifen für je 15 Minuten in SDS-Äquilibrationpuffer zweimal mit dem Zusatz von 15 mM DTT und abschließend mit 150 mM Iodacetamid inkubiert. Die äquilibrierte IEF-Streifen wurden luftblasenfrei auf das Trenngel eines präparativen 13,75% SDS-Gels und mit einer erwärmten SDS-PAGE-Agarose-Lösung versiegelt. Die Gelelektrophorese erfolgte analog zu Kapitel 2.4.5.

Kaliumphosphat-Puffer: 80 mM K_2HPO_4 , 20 mM KH_2PO_4 pH 7,4

Phenol pH 7,4

Rehydratisierungspuffer A: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS, 50 mM DTT

Rehydratisierungspuffer B: 2,625 ml Rehydratisierungspuffer A, 125 µl Ampholyt-Lösung, Bromphenolblau

SDS-Äquilibrationpuffer: 1,0 M Tris-HCl pH 8,8

SDS-PAGE-Agarose-Lösung: 0,5% Agarose in SDS-Äquilibrationpuffer

2.4.18 Kopplung von Proteinen an NHS-aktivierte Sepharose

10 mg rekombinantes Maus-Profilin 1 wurde kovalent an NHS-aktivierte Sepharose einer HiTrapTM-Säule (1 ml Säulenvolumen, GE Healthcare, München) gebunden. Zuerst wurde die Säule mit sechs Milliliter eiskalter 1 mM Salzsäure gewaschen. Umgehend danach wurde die Säule mit dem zu koppelnden Protein, das in Kopplungspuffer vorlag, in Kontakt gebracht. Die Proteinlösung wurde für 30 Minuten im Kreislauf durch die Säule gepumpt. Der Durchfluss wurde anschließend gesammelt und bei 280 nm zur Bestimmung der Kopplungseffizienz photometrisch vermessen. Freie Bindestellen an dem Säulenmaterial wurden über Ethanolamin abgesättigt. Abwechselnd wurde die Säule mit je sechs Milliliter Ethanolamin-Puffer und Acetat-Puffer gewaschen. Abschließend wurde die Säule mit dem 1x Dialyse-Puffer (siehe Kapitel 2.4.8) äquilibriert und bei 4°C gelagert.

1 mM HCl

Kopplungspuffer: 0,2 M $NaCO_3$, 0,5 M NaCl pH 8,3

Ethanolamin-Puffer: 0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl pH 8,3

Acetat-Puffer: 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl pH 4

2.4.19 ELISA

Der „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) erlaubt sowohl qualitative als auch quantitative *in vitro* Analysen von Protein-Interaktionen. In dieser Arbeit wurde der ELISA zur Untersuchung der

Antigen-Spezifität von Antikörpern eingesetzt. Das als Antigen fungierende Protein wurde an einer Polystyrol-Oberfläche immobilisiert. Anschließend wurde das Antigen mit dem zu testenden Antikörper überschichtet. Die Bindung des Antikörpers an das immobilisierte Antigen wurde mittels spezifischer Sekundärantikörper nachgewiesen.

50 pmol Maus-Profilin 1 bzw. Maus-Profilin 2a wurden in Kopplungspuffer über Nacht an die Oberfläche einer 96-well Mikrotiterplatte (Nunc Polysorb) adsorbiert. Ungebundenes Profilin wurde durch dreimaliges Waschen mit ELISA-Puffer entfernt. Freie Bindungsstellen der Polystyrol-Oberfläche wurden pro well durch eine zweistündige Inkubation mit 200 µl einer 1%igen BSA-PBS-Lösung bei Raumtemperatur abgesättigt. Das zu testende Antiserum wurde für eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur hinzu gegeben. Durch wiederholtes Waschen wurden ungebundene Antikörper entfernt. Die Bindung des zu testenden Antikörpers wurde über Sekundärantikörper nachgewiesen, der spezifisch spezieskonservierte Bereiche des zu testenden Antikörpers erkennt. Die Entwicklung des ELISA basiert auf der Aktivität der Meerrettich-Peroxidase (HRP), die an den Sekundärantikörper gekoppelt vorliegt: Als Substrat diente der HRP 2,2-Azinobis-3-Ethylbenzthiazolin-Sulfon-Säure (ABTS), von dem 100 µl in 10 ml Citratpuffer mit 10 µl 30% Wasserstoffperoxid gegeben wurde. Die Farbentwicklung durch den Umsatz des ABTS wurde nach exakt 20 Minuten in einem ELISA-Reader bei 405 nm gemessen.

ELISA-Puffer: 1x PBS, 0,02% (v/v) Tween 20

2% BSA in PBS

Kopplungspuffer: 1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃, pH 9,6, mit H₂O_{dest} auf 1 Liter auffüllen

ABTS-Stammlösung: 21,95 mg/ml, Lagerung bei -20°C in 100 µl Aliquots

Citratpuffer: 0,1 M Citronensäure, 0,1 M Tri-Na-Citrat in H₂O, pH 4

2.5.20 Epitop-Kartierung von monoklonalen Antikörpern

Ein sequentielles Epitop eines monoklonalen Antikörpers kann durch die Verwendung von synthetischen Peptiden ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde eine sogenannte Pepscan-Membran benutzt, auf die 15 Aminosäure lange Peptide, die die Gesamtheit von Maus-Profilin 1 und Maus-Profilin 2a umfassen, synthetisiert wurden (Roland Frank, HZI Braunschweig). Zwischen den einzelnen Peptiden überlappen je 12 Aminosäuren.

Die Pepscan-Membran wurde zunächst mit Ethanol benetzt und anschließend dreimal mit TBS gewaschen. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden über Nacht bei RT mit 10% Kälberserum in TBS abgesättigt. Nach dreimaligen Waschen mit TBS-T wurde die Membran unter Schwenken 3 h mit dem zu testenden Antikörper bei RT inkubiert. Nicht-gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der mit der Alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert ist, erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Antikörper-Bindung durch die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase nachgewiesen, die die Substrate BCIP und NBT in AP-Puffer umsetzt.

Zur Entfernung der gebundenen Antikörper und Färbung aus der AP-Entwicklung wurde die Pepscan-Membran „gestrippt“. Hierfür wurde die Membran zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend solange in Dimethylformamid (DMF) inkubiert, bis die Färbung der Peptide nicht mehr sichtbar war. Nach einer nochmaligen Inkubation mit DMF wurde die Membran dreimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde Membran abwechselnd je dreimal mit Strip-Lösung A unter Schwenken bei RT und anschließend für fünf Minuten in einem Ultraschallbad bei 40°C gewaschen. Danach folgte dreimaliges Waschen mit Strip-Lösung B. Abschließend wurde die Membran dreimal in Ethanol inkubiert. Die Lagerung der Pepscan-Membran erfolgte trocken bei -20°C.

10% FCS (PAA) in TBS-T

AP-Puffer: 25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20, 30 µl BCIP-Stamm-Lösung, 60 µl NBT

BCIP-Stammlösung: 50 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-ptoluidinsalz in Dimethylformamid

NBT-Stammlösung: 50 mg/ml Nitroblau-Tetrazodiumchlorid in Dimethylformamid

Strip-Lösung A: 8 M Harnstoff, 1% (w/v) SDS, 0,5% Mercaptoethanol, pH7 mit Essigsäure einstellen

Strip-Lösung B: 10% Essigsäure, 50% Ethanol, 40% Wasser

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung und Passagieren von adhärenenten Zelllinien

Die in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien wurden in „Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% sowie einem CO₂-Partialdruck von 10% kultiviert. Aufgrund beständiger Proliferation ist das Passagieren adhärenenter Zellen notwendig. Um die Zellen von dem Substrat zu lösen, wird zunächst das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (PAA) inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde die Enzymwirkung des Trypsin durch die Zugabe des doppelten Volumens DMEM + 10% FCS gestoppt, die Zellzahl über eine Neubauer-Zählkammer bestimmt und in geeigneten Verdünnungen in neue Kulturgefäße überführt.

DMEM-Kulturbedium: DMEM (PAA) mit Natriumpyruvat und L-Glutamin; versetzt mit 10% FCS

2.5.2 Transfektion von Zelllinien mittels FuGENE6 (Roche)

Die transiente Transfektion von HeLa sowie HEK293T-Zellen wurde mittels des FuGENE6-Reagenzes (Roche) durchgeführt. Für die Transfektion von Zellen in 10 cm Schalen wurde am Vortag der Transfektion je $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Schale ausgesät. Für die Transfektion wurden pro Kulturschale 6 µl FuGENE6-Agenz in 100 µl Serum freiem DMEM gegeben. Anschließend wurden 3 µg des Plasmids hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde nach einer 20 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur tropfenweise auf die Zellen gegeben. Bei Co-Transfektionen wurden pro Plasmid 3 µg DNA eingesetzt und zunächst miteinander vermischt. Dieses DNA-Gemisch wurde wie beschrieben zu einer FuGENE6-DMEM-Lösung gegeben. Das Verhältnis FuGENE6 (µl) : DNA (µg) beträgt 2:1.

2.5.3 Transfektion tierischer Zellen mittels TransIT-LT1 (Mirus)

Für eine effektive Transfektion primärer Hühnerfibroblasten wurde das Transfektionsreagenz TransIT-LT1 (Mirus) verwendet, das auch für die Transfektion von Mammalia-Zellen einsetzbar ist.

Hühnerfibroblasten wurden am Vortag in einer Dichte von $1,5 \cdot 10^5$ in collagenisierte 10 cm Schalen ausgesät. Für die Transfektion wurden je 6 µg Plasmid, 18 µl Transfektionsreagenz in insgesamt 1,5 ml Serum-freiem DMEM-Medium eingesetzt. Zuerst wurde das Transfektionsreagenz dem Medium zugesetzt und nach vorsichtigem Durchmischen für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die DNA wurde anschließend hinzugegeben und nach nochmaligem Durchmischen für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Im Falle der Hühnerfibroblasten, die mit pcDNA6.2-EMGFP-miR-Konstrukten transfiziert wurden, wurden transfizierte Zelle mit 20 µg/ml Blastidin (PAA) angereichert. Transfizierte Zellen konnten mittels GFP-Expression identifiziert werden.

2.5.4 Collagenisieren von Kulturschalen

Für die Kultivierung primärer Fibroblasten wurden vor dem Aussäen der Zellen die Kulturgefäße mit Collagen beschichtet. Hierfür wurden die Kulturschalen für 5 Minuten mit 0,05%igen Collagen-Lösung beschichtet. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Schalen für zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und zur Gewährleistung der Sterilität für 20 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Gelagert wurden die collagenisierten Schalen bei 4°C.

2.5.5 Präparation und Kultivierung von primären Hühnerfibroblasten

Für die Gewinnung von primären Hühnerfibroblasten war es zunächst erforderlich Hühnereier für 12 Tage in einem Brutschrank bei 37°C und 70% Luftfeuchtigkeit unter beständigem Wenden zu inkubieren. Am Embryonaltag 12 (E12) wurden die Hühnerembryonen mit einer Pinzette aus den Eiern entnommen und dekapitiert. Zur Präparation von Fibroblasten wurde vom Rücken und/oder Kopf Gewebefragmente mit einer Pinzette entnommen und mittels einer feinen Schere weitestgehend mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebefragmente in 2 ml hochreaktivem Trypsin/EDTA (Gibco) aufgenommen, mehrfach auf- und ab pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inhibition des Trypsins wurden die Gewebefragmente mit 10 ml DMEM + 10%FCS versetzt. Das Trypsin wurde letztendlich nach einer Zentrifugation der Zellen bei 400 x g entfernt. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Zelllinien wurden die Hühnerfibroblasten in DMEM neben 10%FCS mit 1% Hühnerembryo-Extrakt (CEE) sowie dem Zusatz der Antibiotika Penicillin, Streptomycin und Gentamycin für maximal 10 Passagen kultiviert.

Um eine beständige Expansion der primären Hühnerfibroblasten zu gewährleisten, wurden die Zellen nur in geringer Zelldichte kultiviert, da eine vollständige Konfluenz der Fibroblasten eine irreversible Einstellung der Proliferation zur Folge hätte.

DMEM + 10% FCS + 1% CEE, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 50 µg/ml Gentamycin

2.5.6 Quantifizierung des endogenen Profilin-Gehalts von Zell- & Gewebeextrakten per Chemolumineszenz

Durch Western Blot-Analysen können in verschiedenen Zell- oder Gewebeextrakten der Grad der Expression eines Proteins bestimmt werden. Hierfür ist es erforderlich, dass die Extrakte exakt die gleiche Proteinkonzentration aufweisen. Außerdem ist bei dem Vergleich der Expressionsstärke verschiedener Proteine im gleichen Gewebe bzw. Zelltyp zu beachten, dass die verwendeten Antikörper mit unterschiedlicher Affinität die Zielproteine binden. In diesem Fall spiegeln die bei der Detektion erhaltenen Signalstärken nicht direkt die Mengen der Proteine wieder. Daher wurden rekombinante Proteine in definierten Mengen zusammen mit den zu untersuchenden Zell- oder Gewebeextrakten per SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mittels ECL analysiert. Im Falle der Profiline wurden rekombinante Profiline in Mengen von 10-150 ng in Eichreihen eingesetzt. Die für endogenes Profilin erhaltenen ECL-Signale wurden zusammen mit den Referenzwerten der rekombinanten Profiline über die Software Herolab Easywin densitometrisch vermessen. Anhand der Signalintensitäten der rekombinanten Profiline konnte die Menge an endogenem Profilin bestimmt und zum Gesamtproteingehalt der Extrakte in Relation gesetzt werden.

2.5.7 Paraformaldehyd-Fixierung & Permeabilisierung adhärenter Zellen

Für die Darstellung der Lokalisation einzelner Proteine ist eine effektive und beständige Fixierung der zellulären Strukturen erforderlich. Aufgrund der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden die Zellen mittels Paraformaldehyd fixiert. Nach Kultivierung der Zellen auf Deckgläschen wurde das Medium durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt. Anschließend erfolgte eine 20 minütige Inkubation der Zellen in 3,7% Paraformaldehyd (in PBS) bei RT. Für die Färbung intrazellulärer Strukturen ist eine anschließende Permeabilisierung der Plasmamembran erforderlich. Dies wird durch eine Behandlung der fixierten Zellen mit 0,02% Triton-X100 (in PBS) erreicht. Dabei ist die Dauer der Triton-Behandlung an die darzustellenden Proteine anzupassen. Für die Färbung von Profilin wurden die fixierten Zellen nach der PFA-Fixierung dreimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend für zwei Minuten mit der erwähnten Detergenz-Lösung behandelt. Nach nochmaligem Waschen mit 1x PBS sowie eine zusätzliche Inkubation der Zellen in 1% BSA (PBS) kann die Färbung der Proteine erfolgen.

4% Paraformaldehyd (PBS)

0,02% Triton-X100 (PBS)

1% BSA (PBS)

Mowiol: 40 g Mowiol 4-88 (Hoechst), 80 ml 1x PBS, 40 ml reinst Glycerin.

Bleichschutz: 2,5 g n-Propylgallat, 50 ml 1x PBS, 50 ml Glycerin

2.5.8 Fluoreszenz-Färbung eukaryontischer Zellen

Zur gleichzeitigen Darstellung von Proteinen in der Fluoreszenzmikroskopie werden zumeist Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet, welche wiederum direkt in den fixierten Strukturen über Spezies spezifische anti-Immunglobulin Sekundärantikörper gebunden werden. An die Sekundärantikörper sind die für die Detektion erforderlichen Fluorochrome kovalent gekoppelt. Nach der in Kapitel 2.5.9 beschriebenen Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden die Primärantikörper gleichzeitig in geeigneter Verdünnung auf die Zellen gegeben und in einer feuchten Kammer bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Ungebundene Primärantikörper wurden, wie oben beschrieben, durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS sowie einer anschließenden Inkubation mit 1% BSA (in PBS) entfernt. Eine 30 minütige Inkubation der Zellen mit Sekundärantikörpern, die jeweils mit unterschiedlich farblichen Fluorochromen gekoppelt waren, erfolgte im Dunkeln bei RT in einer feuchten Kammer. Im Zuge der Sekundärantikörper-Inkubation wurden ggf. Aktin-Filamente durch fluorochromiertes Phalloidin und DNA durch DAPI gefärbt. Nach den Antikörper-Inkubationen wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, kurz in destilliertes Wasser gebracht und mit einem Tropfen N-Propylgallat haltigem Mowiol auf einem Objektträger eingebettet.

2.5.9 Fluoreszenzfärbung eukaryontischer Zellen per Zenon-Technologie

Die innerhalb einer Spezies konservierten Fc-Bereiche von Immunglobulinen sind dafür verantwortlich, dass eine gleichzeitige indirekte Immunfluoreszenz-Färbung mit mehreren, aus der gleichen Spezies stammenden Antikörpern nicht möglich ist. Für eine Doppelfärbung zweier muriner monoklonaler Antikörper wurde die Zenon-Technologie eingesetzt. Diese beruht auf einer Markierung der Primärantikörper, bevor diese mit den darzustellenden Strukturen in Kontakt kommen. Erreicht wird dieses durch Fc-Bereich spezifische Fab-Fragmente, die in einem Reaktionsgefäß mit dem Primärantikörper inkubiert werden (Abb. 2.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die monoklonalen Antikörper 5G6 (Raver1), 2C5 (Profilin 1), 4H5 (Profilin 2a) und 3B11 (Gephyrin) über ein Zenon-Kit markiert, das spezifisch für murine Gamma-Immunglobuline des Isotyps IgG1 ist. Für eine Markierung von Primärantikörpern werden die Fab-Fragmente zu den Primärantikörpern in einem Verhältnis von 6:1 eingesetzt. Dies entspricht für 1 µg Primärantikörper 10 µl der Zenon-Färbelösung. Diese Lösungen werden durchmischt und für fünf Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Nicht gebundene Fab-Fragmente werden durch 10 µl einer IgG-Lösung abgefangen, in dem diese IgG-Lösung wiederum für fünf Minuten bei RT mit dem Gemisch inkubiert wird. Anschließend werden die Zellen mit den Zenon markierten Antikörpern für 30 Minuten versetzt. Nicht gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.

Um eine langsame Translokation der Zenon-Fragmente in dem eingebetteten Objekt zu anderen Primärantikörpern zu verhindern, erfolgt vor der Einbettung eine abschließende, 15 minütige Fixierung mit Paraformaldehyd.

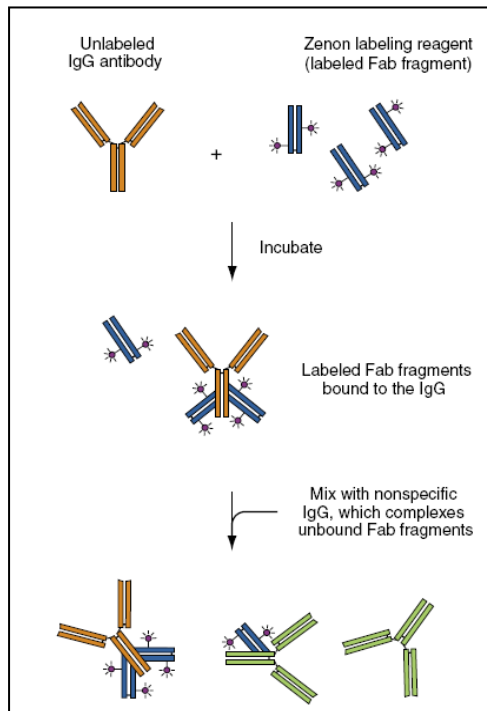


Abb. 2.2: Funktionsprinzip der Zenon-Technologie

(übernommen aus dem Zenon Manual, Invitrogen)

Primärantikörper werden im Reaktionsgefäß mit Fc-Region spezifischen fluorochromierten Fab-Fragmenten inkubiert. Überschüssige Fab-Fragmente werden anschließend durch die Zugabe von unspezifischen Antikörpern abgefangen.

2.4.10 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie können gezielt einzelne Ebenen definierter Schichtdicke von Objekten aufgenommen werden. Zudem ist eine effiziente Trennung unterschiedlicher Fluorochrome möglich, da mittels der Laserkennlinien spezifisch die Wellenlängen der Fluorochrom-Exzitationsmaxima angeregt werden. Zudem werden spezifisch die Emissionsmaxima der Fluorochrome erfasst. Für die Darstellung von Präparaten, in denen bis zu vier unterschiedliche Strukturen gefärbt wurden, wurden die einzelnden Fluorochrome sukzessiv am LSM Meta 510-Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen) mit dem „Multitrack-Verfahren“ der Software „LSM Browser 5“ aufgenommen. Verwendet wurde ein „EC Plan-Neofluar“-Objektiv, das eine 40fache Vergrößerung liefert sowie eine numerische Apertur von 1,3 besitzt. Durch eine vorherige Messung der Fluorochromspektren im „Lambda-Modus“ wurde gewährleistet, dass unter den gewählten Exzitationsbedingungen keine Überschneidungen in den Emissionsspektren der Fluorochrome auftreten.

Tab. 2.9: Spezifikationen zur konfokalen Mikroskopie verschiedener Fluorochrome

Fluorochrom	Exzitation (nm)	Emission (nm)	Laser	Kennlinie
DAPI-DNA	359	461	Enterprise Ar-UV-Laser 351 364 nm 80 mW (Coherent, Dieburg)	364
ECFP	434	474	Multiline Ar-Laser 458 477 488 514 nm 30 mW (Lasos, Ebersberg)	458
Cy2	489	503	Multiline Ar-Laser 458 477 488 514 nm 30 mW (Lasos, Ebersberg)	488
EGFP	489	509	Multiline Ar-Laser 458 477 488 514 nm 30 mW (Lasos, Ebersberg)	488
Alexa488	493	520	Multiline Ar-Laser 458 477 488 514 nm 30 mW (Lasos, Ebersberg)	488
EYFP	500	535	Multiline Ar-Laser 458 477 488 514 nm 30 mW (Lasos, Ebersberg)	488
Cy3	549	562	HeNe 543 nm 1 mW (Lasos, Ebersberg)	543
Alexa568	576	603	HeNe 543 nm 1 mW (Lasos, Ebersberg)	543
Cy5	646	664	HeNe 633 nm 5 mW (Lasos, Ebersberg)	633
Alexa647	653	669	HeNe 633 nm 5 mW (Lasos, Ebersberg)	633

Zur Quantifizierung der Fluoreszenzsignale wurden die konfokalen Aufnahmen mit dem frei erhältlichen Programm ImageJ (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA) ausgewertet. Die Aufnahmen wurden Hintergrund bereinigt, Areale markiert und vermessen. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden mittels Excel-Tabellenkalkulation (Microsoft, Redmond, USA) statistisch ausgewertet.

2.4.11 Untersuchung des Anheftungs- und Ausbreitungsverhaltens von Zellen

Die Geschwindigkeit des Ausbreitens der Zellen wurde in einem „Spreading“-Experiment untersucht. Im Falle primärer Hühnerfibroblasten wurden 1×10^5 Zellen pro Collagen beschichteten Deckgläschen ausgesät. Nach 30 minütiger Inkubation unter Kultivierungsbedingungen wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen, mit Paraformaldehyd gefärbt und mit Phalloidin-TRITC das Aktin-Cytoskelett gefärbt. Für die Auswertung des „spreading“-Experimentes wurden die Zellen anhand morphologischer Unterschiede in zwei Kategorien unterteilt: Flache, weit ausgebreitete Zellen mit einer Vielzahl an Aktin-Filamenten (1) und runde, kompakte Zellen ohne erkennbare Aktin-Filamente bzw. bestenfalls rudimentären kurzen Ausläufern (2).

2.4.12 Chemotaxis von Zellen durch Filtereinsätze

Für die Analyse der Zellmigration wurde die chemotaktische Bewegung von Zellen genutzt. Die Wanderung der Zellen wurde anhand von Filtern ermittelt, die mit 8 μm großen Poren versehen sind. Durch diese transparenten Filter erfolgte die Migration der Zellen entlang eines Nährstoffgradienten.

Zu analysierende Hühnerfibroblasten wurden über Nacht in serumarmem Medium gehalten. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit einer Zellzahl von 1×10^5 in die Zellkultur-Filtereinsätze in serumarmen Medium ausgesät. Die Filtereinsätze wurden anschließend in 12well-Platten überführt, in denen sich pro well 1 ml DMEM-Medium mit 20%-FCS befand. Die Migration von Hühnerfibroblasten wurde über sechs Stunden verfolgt. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und die DNA per DAPI gefärbt. Zur Bestimmung der Anzahl migrierter Zellen wurden Sichtfelder oberhalb und unterhalb der Filtereinsätze konfokal aufgenommen und statistisch ausgewertet.

DMEM –FCS + 0,5% CEE

DMEM + 20% FCS + 1% CEE

2.4.13 Stimulation kultivierter Neurone mit N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)

Zur Stimulation excitatorischer Synapsen wurden dissoziierte, hippocampale Ratten-Neurone (zur Verfügung gestellt von Nina Wittenmayer (Universität Heidelberg)) mit N-Methyl-D-Aspartat (NMDA, Sigma) behandelt. Hierfür wurden Neurone in Tyrods-Lösung überführt und für 30 Minuten mit $10 \mu\text{M}$ NMDA bei 37°C inkubiert. Umgehend nach der NMDA-Inkubation wurden die Neurone mit PFA fixiert und mit Profilin-spezifischen Antikörpern gefärbt.

Tyrods-Lösung: 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 33 mM Glukose, 2 mM MgCl_2 , 2mM CaCl_2 , 2 mM Glycin

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die funktionelle Diversität der Profilin-Isoformen 1 und 2a, die im zentralen Nervensystem von Mammalia co-exprimiert werden, analysiert. Zwar wurden bereits verschiedene Arbeiten anderer Forschergruppen zu dieser Thematik durchgeführt, jedoch wurden in den meisten Studien die Profile 1 und 2a meist getrennt voneinander analysiert. Bisherige Untersuchungen der neuronalen Profilin-Isoform 2a führten zu verschiedenen Hypothesen zur zellulären Funktion. Einige Befunde, die durch Analysen von Profilin 2a defizienten Mäusen erzielt wurden, deuten auf eine maßgebliche Funktion in der Regulation von Endocytose und Exocytose in Neuronen hin (Gareus et al., 2006; Pilo-Boyl et al., 2007). Andere Arbeitsgruppen kamen anhand von Überexpressionsexperimenten sowie Lokalisationsstudien zu Resultaten, die auf eine Rolle von Profilin 2a in der strukturellen Plastizität von Synapsen schließen lassen (Ackermann & Matus, 2003; Lamprecht et al., 2006). Welche dieser Funktionen für Profilin 2a (PFN2a) zutreffend ist, und wie die ubiquitär exprimierte Isoform Profilin 1 (PFN1) in neuronale Prozesse involviert ist, wurde in dieser Arbeit untersucht. Dies erfolgte anhand von Co-Lokalisationsstudien und funktioneller Analysen auf Basis der RNA-Interferenz (RNAi). Für diese Analysen war es zunächst erforderlich, Profilin-Isoform-spezifische Antikörper herzustellen.

3.1 Generierung Profilin-Isoform spezifischer Antikörper

Im Gegensatz zu pflanzlichen Profilinen, die eine große Gruppe an Allergenen darstellen, sind Mammalia-Profiline nur sehr bedingt immunogen (Radauer & Breiteneder, 2007). Dies mag ein Grund dafür sein, weshalb bis zu dieser Arbeit nur in zwei Studien eine erfolgreiche Generierung von monoklonalen Profilin Antikörpern beschrieben worden ist (Mayboroda et al., 1997; Sharma et al., 2005). Aufgrund hoher Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Profilin-Isoformen eines Organismus besteht bei Profilin-Antikörpern zusätzlich das Problem der Kreuzreaktion. Um die selektive Erkennung einer Profilin-Isoform zu ermöglichen, kann zumindest bei polyklonalen Antiseren eine Affinitätsreinigung vorgenommen werden, bei der unerwünschte Antikörper eliminiert werden.

3.1.1. Affinitätsreinigung des anti-Profilin 2a-Serums # 361

Vor Beginn dieser Arbeit war in unserer Arbeitsgruppe bereits das Antiserum #361 verfügbar, das durch die Immunisierung mit einem C-terminalen Peptid des murinen Profilin 2a (mPFN2a) hergestellt wurde. Obwohl das Peptid nur wenige Aminosäuren mit dem C-Terminus von Maus-Profilin 1 (mPFN1) gemein hat, zeigt dieses Antiserum eine Kreuzreaktion mit PFN1.

Die Anwesenheit von PFN1-spezifischen Antikörpern ist wahrscheinlich auf einer während der Immunisierung eingetretenen Auto-Immunreaktion zurückzuführen. Zur Entfernung PFN1-spezifischer Antikörper wurde das Antiserum #361 mit immobilisiertem mPFN1 affinitätsgereinigt. Vor sowie nach Auftrag auf die mPFN1-Säule wurde das Antiserum in einem ELISA-Experiment getestet, in dem je 50 pmol gereinigtes mPFN1 und mPFN2a als Test-Antigene eingesetzt wurden (Abb.3.1). Als Kontrolle wurde ein mPFN1-spezifisches Antiserum verwendet, das allerdings nicht mehr für fluoreszenzmikroskopische Studien geeignet ist (Buss et al., 1992).

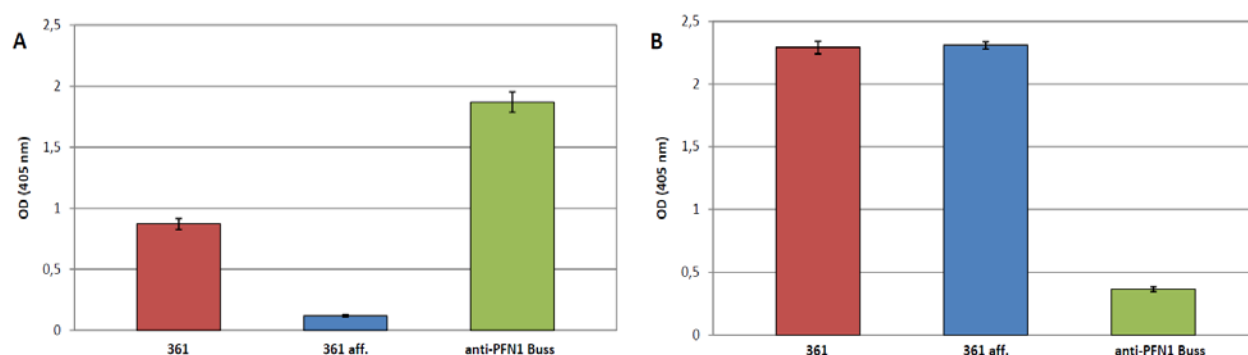


Abb. 3.1: Spezifität des Antiserums #361 nach Affinitätsreinigung mit Profilin 1

Das Antiserum #361 wurde mit immobilisiertem mPFN1 einer Affinitätsreinigung unterzogen. Die Reaktivität des Antiserums wurde vor (#361) und nach Affinitätsreinigung (#361 aff.) im ELISA mit 50 pmol mPFN1 (A) und 50 pmol mPFN2a (B) getestet. Als Kontrolle wurde das mPFN1-spezifische Buss-Antiserum eingesetzt.

Abbildung 3.1 zeigt, dass das Antiserum #361 nach der Affinitätsreinigung keine signifikante Kreuzreaktion mit mPFN1 mehr besitzt, während die Affinität zu mPFN2a durch die Affinitätsreinigung nicht beeinträchtigt wurde. In Kapitel 3.4.2 ist die Spezifität dieses Antiserums für PFN2a in Western Blot-Analysen dargestellt. Fluoreszenzfärbungen von endogenem PFN2a sind mit diesem Serum prinzipiell möglich, jedoch ist die erreichbare Signalstärke speziell für die Darstellung feiner Strukturen in Neuronen kaum ausreichend. Daher wurden PFN2a-spezifische monoklonale Antikörper generiert, die in fluoreszenzmikroskopischen Anwendungen hohe Signalstärke liefern sollten.

3.1.2 Charakterisierung des monoklonalen anti-Profilin 2a Antikörpers 4H5

Mit gereinigtem genuinen Rinder-Profilin 2a wurden von Sabine Buchmeier (TU-Braunschweig) Mäuse immunisiert und anschließend erzeugte Hybridoma-Zellen hinsichtlich der Produktion mPFN2a spezifischer Antikörper in ELISA-Experimenten selektiert. Dieser Versuchsansatz ergab eine Vielzahl von Hybridoma-Klonen, deren Antikörper nur das neuronale PFN2a im ELISA binden konnten.

Für eine weiterführende Charakterisierung wurde die Affinität der Antikörper zu nativem sowie denaturiertem PFN1 und PFN2a bestimmt. Als native Antigene dienten in einem Dot Blot neben BSA rekombinantes mPFN1 und mPFN2a. Im Western Blot wurde unter Verwendung von rekombinantem mPFN1 und mPFN2a sowie Maushirn-Extrakt die Bindung der Antikörper an denaturiertes Profilin getestet.

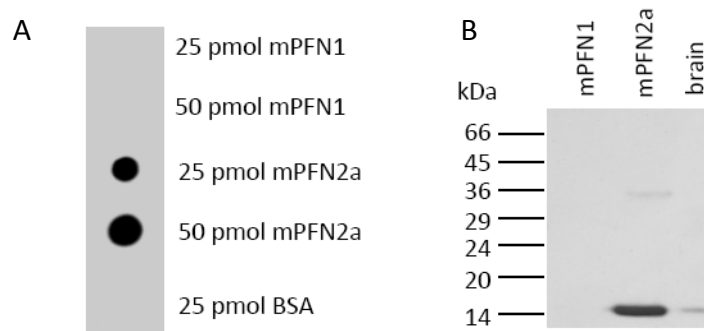


Abb. 3.2: Spezifität des monoklonalen anti-Profilin 2a-Antikörpers 4H5

Im Dot Blot wurden 25 pmol bzw. 50 pmol natives mPFN1 und mPFN2a sowie 25 pmol BSA auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen (A). Die Spezifität des Antikörpers 4H5 wurde im Western Blot mit rekombinantem mPFN1, mPFN2a sowie Maushirn-Extrakt untersucht (B). Die Entwicklung von Dot Blot und Western Blot erfolgte nach einem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper per Chemolumineszenz (ECL). Der Antikörper 4H5 erkennt einzig PFN2a.

Unter den verschiedenen Antikörpern erkannte einzig der IgG1-Antikörper 4H5 sowohl natives als auch denaturiertes mPFN2a (Abb. 3.2 A, B). Im Fall des rekombinanten PFN2a trat neben der 15 kDa PFN2a-Bande bei 32 kDa ein zusätzliches sehr schwaches Signal auf, das vermutlich auf eine geringe Menge an PFN2a-Dimeren zurückgeht. In keinem Experiment konnte eine Kreuzreaktion des Antikörpers 4H5 mit mPFN1 beobachtet werden. Neben rekombinanten Proteinen erkennt der Antikörper 4H5 auch genuines mPFN2a. Allerdings scheint der Antikörper 4H5 mit geringerer Affinität denaturiertes mPFN2a zu binden. Die Spezifität dieses Antikörpers einzig für das neuronale PFN2a wurde zusätzlich durch die Kartierung des Epitops, die spezifische Färbung ektopisch mPFN2a exprimierender Zellen sowie die in Kapitel 3.3.2 dargestellten RNAi-Experimente bestätigt. Durch die Nutzung einer „Pepscan“-Membran, auf die überlappende Oligopeptide sowohl von mPFN1 als auch mPFN2a synthetisiert worden waren, konnte in Zusammenarbeit mit Sabine Buchmeier (TU Braunschweig) das Epitop des Antikörpers 4H5 kartiert werden (Abb. 3.3). Es handelt sich bei dem Epitop um die Aminosäure-Sequenz „KKAYSMAK“, die sich oberflächenexponiert in der C-terminalen α -Helix des PFN2a-Moleküls befindet und laut Datenbankanalysen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nur in PFN2a vorkommt (Abb. 3.3).



Abb. 3.3: Epitopkartierung des anti-PFN2a Antikörpers 4H5

Mittels einer Membran mit überlappenden synthetischen Peptiden von mPFN1 und mPFN2a wurde die Sequenz „KKAYSMAK“ als Epitop des Antikörpers 4H5 ermittelt. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte über Alkalische Phosphatase-gekoppelte Sekundärantikörper (links). Die Oberflächenstruktur des mPFN2a zeigt die exponierte Lage des Epitops (rechts, blau hervorgehoben). Für die Modellierung der mPFN2a-Oberflächenstruktur wurde das Programm PyMol eingesetzt (Kursula et al., 2008).

Die Verwendbarkeit in immunocytochemische Anwendungen sowie die Isoform-Spezifität des Antikörpers 4H5 wird durch die Immunfluoreszenz-Färbung von ektopisch mPFN2a exprimierenden C2C12-Myoblasten demonstriert (Abb. 3.4). Hierfür wurden C2C12-Zellen transient mit GFP-mPFN2a transfiziert, 36 h nach Transfektion fixiert und mit dem Antikörper 4H5 gefärbt.

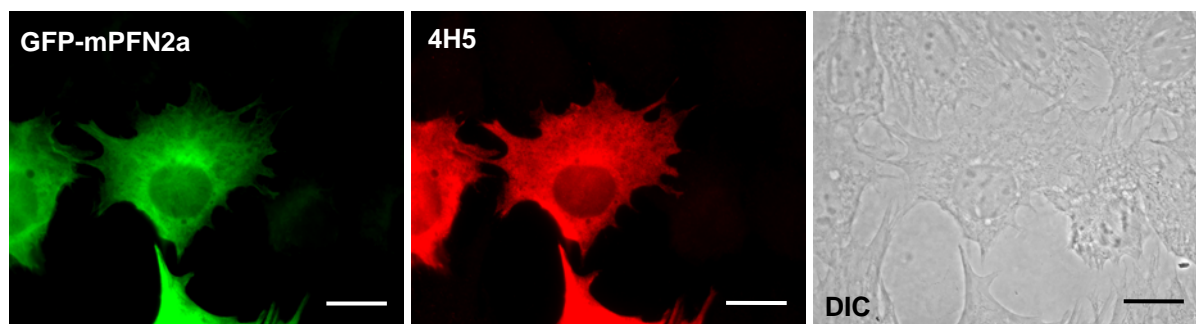


Abb. 3.4: Nachweis der Spezifität des anti-PFN2 Antikörpers 4H5 in Profilin 2a exprimierenden Zellen

C2C12-Myoblasten wurden transient mit pEGFP-C2-mPFN2a transfiziert. Nach 36h wurden die Zellen fixiert und mPFN2a mit dem Antikörper 4H5 und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (Balken 10 µm).

Nur GFP-PFN2a exprimierende C2C12-Zellen zeigten eine intensive Färbung mit dem Antikörper 4H5. Mit diesen Ergebnissen wurde deutlich, dass mit dem Antikörper 4H5 ein geeignetes Werkzeug zur Verfügung steht, um PFN2a spezifisch in Zellen nachzuweisen.

3.1.3 Charakterisierung des monoklonalen Profilin 1 Antikörpers 2C5

Zu Beginn dieser Arbeit stand für Analysen von PFN1 in unserer Arbeitsgruppe nur der monoklonale Antikörper 2H11 zur Verfügung, der jedoch kein mPFN1 erkennt (Mayboroda et al., 1997). Insbesondere für die Untersuchung der differentiellen Funktionalität von PFN1 und PFN2a im ZNS von Maus und Ratte war es daher erforderlich, mPFN1-spezifische Antikörper zu generieren. Zur Immunisierung wurde kein gereinigtes mPFN1 als Antigen eingesetzt, da aufgrund dessen Auto-Antigenizität eine schwache Immunantwort zu erwarten gewesen wäre. Stattdessen wurden künstliche polyhedrale Nanopartikel, die über Oberflächen exponierte mPFN1-Peptidsequenzen verfügen, zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt (Abb. 3.5, zur Verfügung gestellt von PD Dr. Cora-AnnSchönenberger, Universität Basel; Raman et al., 2006, Schroeder et al., 2008 Manuscript submitted). Die durch die Nanopartikel präsentierten mPFN1-Sequenzen basieren auf dem korrespondierenden Epitop des Rinder-Profilin 1-spezifischen Antikörpers 2H11, der in einer Vielzahl verschiedener Anwendungen einsetzbar ist (Mayboroda et al., 1997). Insgesamt konnten zwei monoklonale Antikörper vom Typ IgG1, 2C5 und 1A11, generiert werden, die hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit charakterisiert wurden. Die Charakterisierung des Antikörpers 1A11 ist aufgrund seiner Verwendung in Experimenten mit Hühnerfibroblasten in Kapitel 3.4.2 dargestellt.

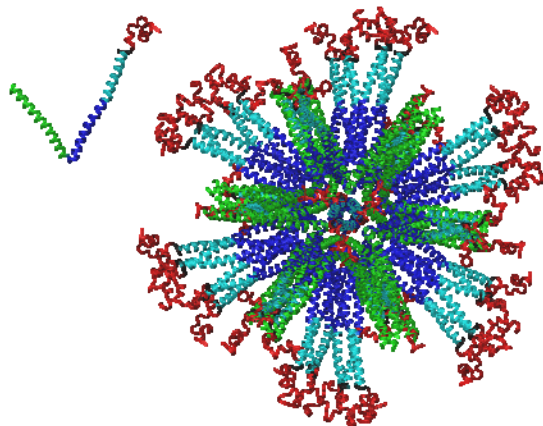


Abb. 3.5: Struktureller Aufbau der polyhedralen Nanopartikel

Strukturmodell eines zur Immunisierung verwendeten Nanopartikels. Die mPFN1-spezifischen Peptide sind in rot hervorgehoben; in blau und grün sind die „coiled-coiled“ angeordneten helikalen Bestandteile des Nanopartikel-Gerüsts dargestellt (Schroeder et al., 2008, manuscript submitted).

Die Reaktivität des Antikörpers 2C5 wurde zunächst im Western Blot getestet, in dem rekombinantes mPFN1 und mPFN2a sowie muriner Milz-Extrakt eingesetzt wurde. Im Gegensatz zum PFN2a-spezifischen Antikörper 4H5 verfügt der Antikörper 2C5 über die Fähigkeit, denaturiertes PFN1 mit hoher Affinität zu binden (Abb. 3.6). In Zusammenarbeit mit Sabine Buchmeier (TU-Braunschweig) wurde die Spezifität des Antikörpers durch eine Epitop-Kartierung mittels „Pepscan-Membran“ bestätigt. Als Epitop wurde die Sequenz „NAYIDSLM“ des eingesetzten mPFN1-Peptids erkannt.

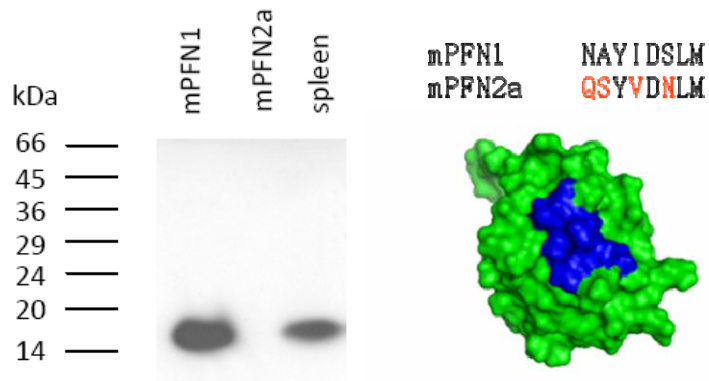


Abb. 3.6: Darstellung der Spezifität des Antikörpers 2C5

Die Spezifität des Antikörpers 2C5 wurde im Western Blot mit rekombinantem mPFN1 und mPFN2a sowie murinem Milzextrakt untersucht. Der Antikörper 2C5 bindet ausschließlich PFN1. Das Epitop des Antikörpers wurde mittels der in Abb. 3.3 gezeigten Membran mit synthetischen Profilin-Peptiden bestimmt. Der Antikörper 2C5 bindet die Aminosäure-Sequenz „NAYIDSLM“. Diese Aminosäure-Sequenz ist divergent zwischen mPFN1 und mPFN2a (Sequenzunterschiede sind in rot hervorgehoben) und im Profilin-Molekül oberflächenexponiert (im Strukturmodell von PFN1 blau markiert).

Um die Verwendbarkeit des Antikörpers 2C5 in Co-Lokalisationsstudien zu untersuchen, wurden C2C12-Myoblasten, die einzig endogenes mPFN1 exprimieren, ausgesät, fixiert und mit dem Antikörper 2C5 sowie mit Phalloidin-FITC gefärbt. Die Auswertung dieser Zellen erfolgte mittels konfokaler „Laser scanning“-Mikroskopie (Abb. 3.7).

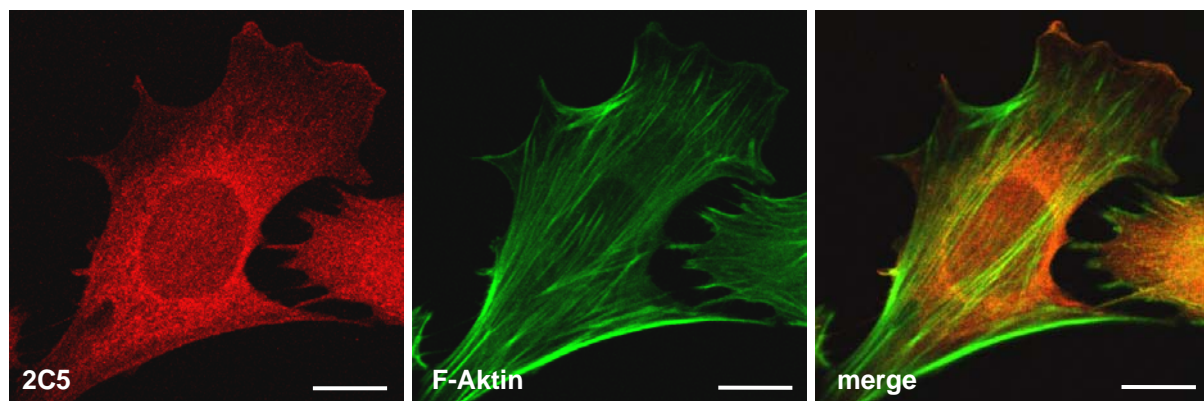


Abb. 3.7: Fluoreszenzfärbung von endogenem Profilin 1 durch den Antikörper 2C5 in C2C12-Myoblasten

mPFN1 wurde in PFA-fixierten C2C12-Myoblasten mit dem Antikörper 2C5 und Cy3-gekoppelten anti-Maus-IgG Sekundärantikörpern gefärbt. Zusätzlich wurden Aktin-Filamente mit Phalloidin-FITC markiert. Die Fluoreszenzfärbungen wurden konfokal aufgenommen (Balken: 10 µm).

Mit dem Antikörper 2C5 lässt sich endogenes mPFN1 mit hoher Signalintensität anfärben. Die durch den Antikörper 2C5 dargestellten Strukturen stimmen mit den Lokalisationsstudien von PFN1 in Rattenfibroblasten überein (Buss et al., 1992): PFN1 weist im Cytoplasma eine punktiert erscheinende Verteilung auf, wobei PFN1 in der Führungslamelle der Zellen angereichert ist. In C2C12-Zellen ist mit dem Antikörper 2C5 auch PFN1 in den Zellkernen nachweisbar. Allerdings ist die Konzentration an PFN1 im Zellkern deutlich geringer als im Cytoplasma.

Diese Kombination an Analysen zeigt, dass mit dem Antikörper 2C5 eine spezifische Darstellung von PFN1 in Zellen und biochemischen Anwendung möglich ist. Entsprechend wurde der Antikörper 2C5 neben dem anti-PFN2a-Antikörper 4H5 in Immunfluoreszenzstudien eingesetzt.

3.2 Lokalisation von Profilin 1 und Profilin 2a in neuronalen Zellen

Wie bereits erwähnt, wurden bisher PFN1 und PFN2a in neuronalen Zellen meist getrennt voneinander betrachtet (Neuhoff et al., 2005; Schubert et al., 2006; Pilo-Boyl et al., 2007). Da beide Profilin-Isoformen mit einer Vielzahl identischer Liganden interagieren können, stellt sich die Frage, ob sie beide auch in denselben Strukturen neuronaler Zellen lokalisiert sind. Mit Hilfe der in dieser Arbeit charakterisierten Profilin-Antikörper war es möglich, der potenziell unterschiedlichen Lokalisation von PFN1 und PFN2a in Co-Lokalisations-Experimenten nachzugehen.

3.2.1 Doppelfärbung monoklonaler Antikörper per Zenon-Technologie

Aufgrund der innerhalb einer Spezies konservierten Bereiche von Immunglobulinen ist die Darstellung beider Profile mit den monoklonalen Antikörpern 2C5 und 4H5 über immuncytochemische Standardmethoden nicht möglich. Alternativ zu der herkömmlichen indirekten Immunfluoreszenzfärbung, bei der mehrere Sekundäntikörper simultan Antigen gebundene Primäntikörper in den Zellen binden, können verschiedene monoklonale Primäntikörper sukzessiv markiert und mit den zu färbenden Strukturen in Kontakt gebracht werden. Entscheidend ist hierbei eine räumlich getrennte Fluorochromierung der jeweiligen Primäntikörper, ohne dass diese ihre Bindungseigenschaften verlieren. Eine Möglichkeit, Primäntikörper in Reaktionsgefäßen zu fluorochromieren, ist die Zenon-Technologie (Invitrogen). Diese Technik bedient sich fluorochromierter Fab-Fragmente, die mit hoher Affinität in kurzer Zeit auch ungereinigte Immunglobuline selektiv binden. Die derart *in vitro* markierten Antikörper können anschließend zu fixierten und permeabilisierten Zellen gegeben werden.

In dieser Arbeit wurde für die Darstellung von PFN1 und PFN2a eine Kombination aus herkömmlicher indirekter Immunfluoreszenzfärbung und der Zenon-Technologie verwendet.

Diese Vorgehensweise birgt theoretisch zwei Fehlerquellen: Einerseits könnten die Zenon-Fab-Fragmente langsam zwischen den Primärantikörpern translozieren, während andererseits eine Rekrutierung der Zenon markierten Primärantikörper durch die Paratope der in den Zellen gebunden vorliegenden Sekundärantikörper stattfinden könnte.

Die Translokation der Zenon-Fab-Fragmente kann in Übereinstimmung mit den Herstellerangaben effektiv durch eine zusätzliche Fixierung mit Paraformaldehyd unterbunden werden. Um im Vorfeld den Grad einer unspezifischen Rekrutierung von Zenon-markierten Antikörpern zu untersuchen, wurden C2C12-Zellen ausgesät, fixiert und Proteine gefärbt, die in unterschiedlichen Kompartimenten vorkommen. Hierfür wurde das mitochondriale „heat shock protein 70“ (mHSP70) und das „heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP)“ Raver1 ausgewählt. Bei mHSP70 handelt es sich um ein Chaperon, das einzig in den Mitochondrien zu finden ist (Syken et al., 1999). Raver1 ist als hnRNP-Protein beschrieben, das in Abhängigkeit der Muskeldifferenzierung seine Lokalisation vom Nucleus in Strukturen des Sarkomers ändert. In undifferenzierten Myoblasten wie den hier verwendeten C2C12-Zellen lokalisiert Raver1 überwiegend im Zellkern (Zieseniss et al., 2007). mHSP70 wurde indirekt über einen monoklonalen Primär-Antikörper und einen Cy3-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper gefärbt. Anschließend erfolgte die Zugabe des anti-Raver1 Antikörpers 5G6 zu den Zellen, der mittels Alexa488-konjugierter Zenon-Fab-Fragmente zuvor markiert wurde.

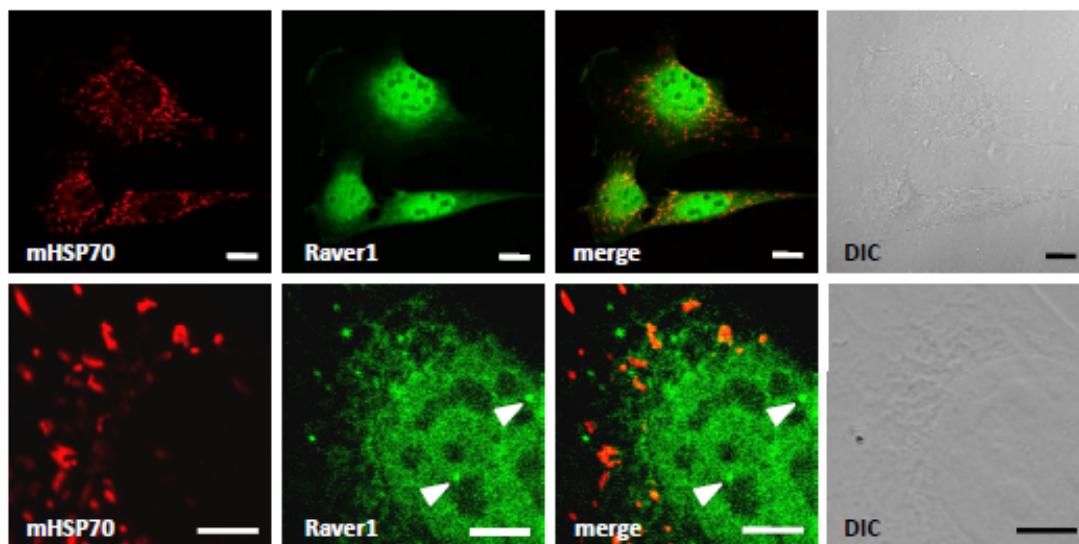


Abb. 3.8: Doppelfärbung von Raver1 und mHSP70 in C2C12-Myoblasten mittels monoklonaler Antikörper

mHSP70 wurde in C2C12-Myoblasten indirekt mit Primärantikörpern und Cy3-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörpern gefärbt. Anschließend wurde Raver1 über den monoklonalen Antikörper 5G6 gefärbt, der *in vitro* mit Alexa488-gekoppelten Zenon-Fab-Fragmenten markiert wurde. Die gefärbten Zellen wurden konfokal aufgenommen (Balken: 5 μ m). Raver1-positive „perinucleolar compartments (PNC)“ sind durch Pfeilspitzen

hervorgehoben.

Durch dieses Verfahren konnten mHSP70 und Raver1 in C2C12-Zellen in den Mitochondrien bzw. im Zellkern nachgewiesen werden. Die Spezifität der Raver1-Färbung mittels der Zenon-Technologie wird durch die Färbung sogenannter „perinucleolar compartments (PNC)“ im Zellkern hervorgehoben (Abb. 3.8, Pfeilspitzen). Hochauflösende konfokale Fluoreszenzmikroskopie zeigte darüberhinaus, dass Raver1 auch perinuclear im Cytoplasma lokalisiert (untere Bildreihe Abb. 3.8). Eine Überlagerung der Raver1 und mHSP70-Färbungen verdeutlicht, dass keine Rekrutierung des Zenon markierten anti-Raver1-Antikörpers 5G6 durch den in den Mitochondrien mHSP70 vorliegenden anti-Maus Sekundärantikörper stattfand.

Diese Färbungen zeigen eindeutig, dass die Darstellung zellulärer Strukturen mit mehreren monoklonalen Primärantikörpern prinzipiell möglich ist. Folglich konnten PFN1 und PFN2a mit Hilfe der vorgestellten monoklonalen Antikörper 2C5 und 4H5 in neuronalen Zellen gleichzeitig untersucht werden. Zu Beginn wurde die Lokalisation der Profilin-Isoformen mit besonderem Augenmerk auf synaptische Strukturen untersucht.

3.2.2 Lokalisation der Profilin-Isoformen 1 und 2a in Synapsen

Zur Analyse einer möglichen differenziellen Lokalisation von PFN1 und PFN2a wurden dissoziierte Hippocampus-Neuronen aus der Maus verwendet, die 14 Tage (DIV14) kultiviert wurden (zur Verfügung gestellt von Kristin Michaelsen (TU Braunschweig)). Als Marker-Proteine sämtlicher Präsynapsen wurden die Synapsine 1 und 2 ausgewählt. Diese Proteine, die in den präsynaptischen Kompartimenten lokalisieren, wurden in den fixierten hippocampalen Neuronen jeweils in Kombination mit einer Profilin-Isoform gefärbt (Abb. 3.9 A, B). Für den direkten Nachweis einer möglichen differenziellen Lokalisation der Profiline wurden die Antikörper 2C5 und 4H5 gleichzeitig mit dem Synapsin-Antiserum in einer Tripelfärbung eingesetzt (Abb. 3.9 C, D): Die Antigen gebundenen PFN2a- sowie die Synapsin-Antikörper wurden in den Zellen durch Cy3- bzw. Cy5-gekoppelte Sekundärantikörpern gefärbt. Anschließend wurde der PFN1-Antikörper 2C5 mittels Alexa488-gekoppelter Zenon-Fab-Fragmente markiert und zu den Neuronen gegeben. Anhand konfokaler Aufnahmen ist zu erkennen, dass PFN1 neben einigen punktförmigen Anreicherungen homogen in den Neuriten verteilt ist. Diese PFN1-Anreicherungen co-lokalisieren eher vereinzelt mit synaptischen Strukturen (Abb. 3.9 A, Pfeile). Hingegen ist PFN2a in einer Vielzahl distinkter Strukturen in den Neuriten zu finden, die überaus häufig mit Synapsin positiven Regionen co-lokalisieren (Abb. 3.9 B-D, Pfeile in D). Somit konnte durch die gleichzeitige Verwendung zweier hochspezifischer Profilin-Antikörper erstmals eine differenzielle Lokalisation von PFN1 und PFN2a in Synapsen nachgewiesen werden. Da es sich bei den gefärbten Synapsinen um Proteine der präsynaptischen Kompartimente handelt, wurde anschließend untersucht,

inwiefern die beiden Profilin-Isoformen in postsynaptischen Strukturen lokalisieren.

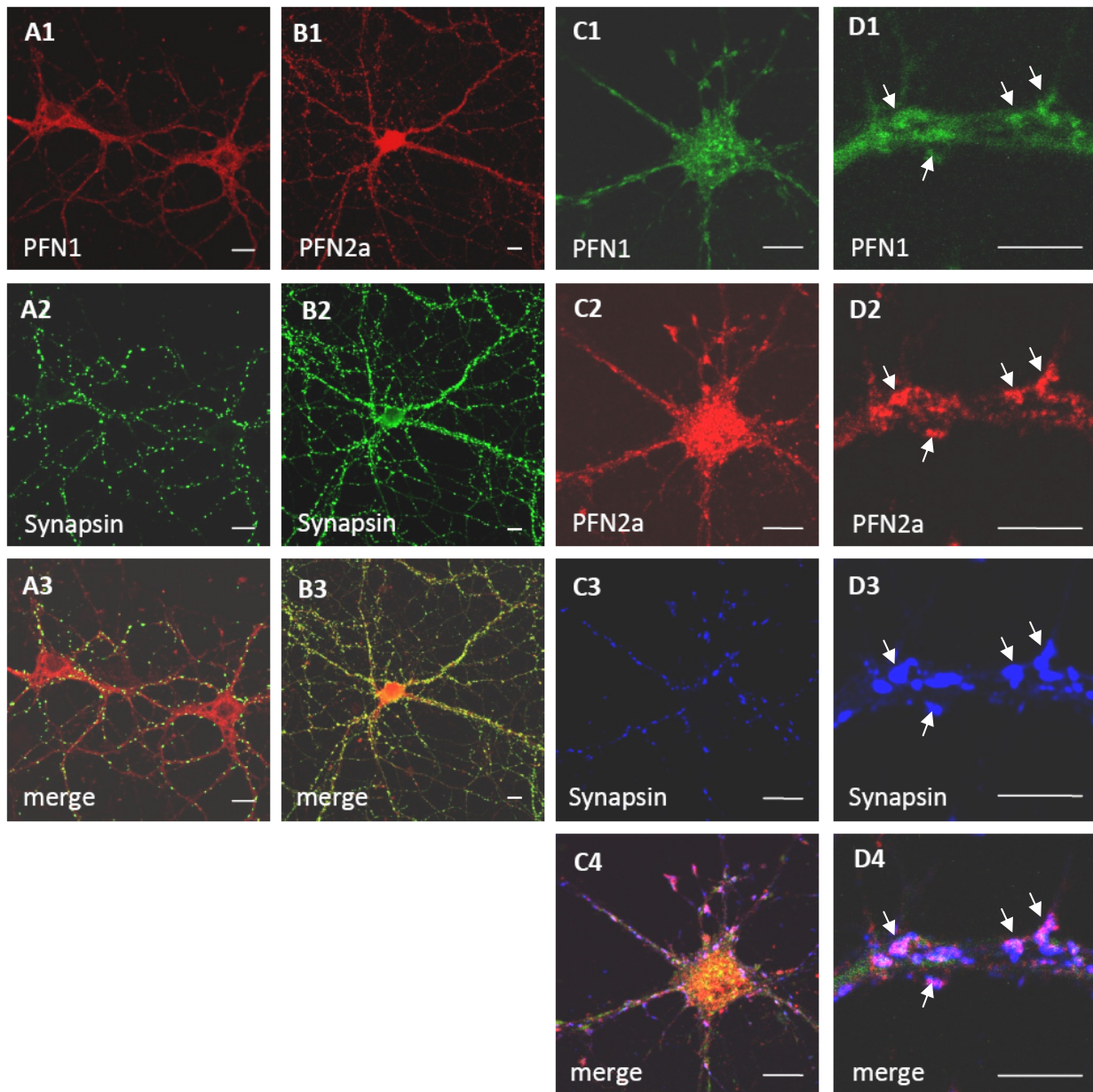


Abb. 3.9: Darstellung von Profilin 1 und 2a in Synapsen

PFN1 und PFN2a wurden mit den Antikörpern 2C5 und 4H5 (rot) jeweils in Kombination mit Synapsin 1 und 2 (grün) gefärbt (A, B). In den Ansätzen C und D ist eine Tripelfärbung von PFN1 (grün), PFN2a (rot) und Synapsin 1 und 2 (blau) dargestellt. Der PFN2a-spezifische Antikörper 4H5 wurde mit Cy3-gekoppelten anti-Maus-IgG-Sekundär-Antikörpern markiert, während das Synapsin 1 und 2-spezifische Antiserum durch Cy5-konjugierte anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper gefärbt wurde. Die Darstellung von PFN1 erfolgte mittels des Antikörpers 2C5, an den zuvor Alexa488-konjugierten Zenon-Fragmenten gebunden wurden. Die Aufnahmen wurden konfokal erstellt (Balken 10 µm). Zu beachten ist, dass sich in Ansatz C die optische Ebene unterhalb des Zellkerns befindet.

3.2.3 Co-Lokalisation von Profilin 1 und 2a mit Gephyrin

Das Gerüstprotein Gephyrin, das Glycin- und GABA-Rezeptoren zu Clustern organisiert, wird *in vitro* mit nahezu gleicher Affinität von PFN1 und PFN2a gebunden (Giesemann et al., 2003). Ergänzend zu diesen biochemischen Interaktionsstudien sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden, ob eine Profilin-Isoform in den Dendriten bevorzugt mit synaptischen und/oder extra-synaptischen Gephyrin-Clustern co-lokalisiert.

Analog zum gleichzeitigen Nachweis beider Profiline wurden Gephyrin und jeweils eine Profilin-Isoform in Neuronen (DIV14) mit monoklonalen Antikörpern markiert. Für die Färbung von Gephyrin wurde der monoklonale Antikörper 3B11 verwendet, der in immuncytochemischen Anwendungen hohe Signalstärken liefert (persönliche Mitteilung Sabine Buchmeier (TU Braunschweig)). Die Färbung der Profiline erfolgte mittels der Antikörper 2C5 und 4H5, die in den fixierten Zellen über Cy3-gekoppelte anti-Maus Sekundärantikörper nachgewiesen wurden. Zur gleichzeitigen Darstellung von Gephyrin wurde der Antikörper 3B11 über Alexa488-konjugierte Zenon-Fragmente markiert und zu den bereits mit Profilin-Antikörpern behandelten Zellen gegeben (Abb. 3.10).

Wie im Fall der Synapsin-Färbung co-lokalisiert PFN1 nur vereinzelt mit Gephyrin-Clustern (Abb. 3.10, Pfeile), während PFN2a überaus häufig in diesen Strukturen präsent ist (Abb. 3.10 B). Aufgrund der homogenen Verteilung des PFN1 sowie der eindeutigen Anreicherung von PFN2a in Gephyrin-Clustern wurde auf eine Färbung beider Profiline zusammen mit Gephyrin verzichtet.

Stattdessen wurde untersucht, ob PFN2a gemäß der gängigen Hypothesen zum Aufbau inhibitorischer Synapsen nur in synaptischen Gephyrin-Clustern lokalisiert oder auch in extra-synaptischen Gephyrin-Aggregaten zu finden ist (Kneussel & Loebrich, 2007). Für die Unterscheidung von synaptischen und extra-synaptischen Gephyrin-Cluster wurden dissoziierte Neurone zusätzlich zur Darstellung von Gephyrin und PFN2a mit „vesicular GABA transporter (VGAT)“-spezifischen Antikörpern gefärbt (Abb. 3.10, C, D). VGAT ist im Gegensatz zu Synapsinen nur in inhibitorischen Präsynapsen vorhanden (Chaudhry et al., 1998). Synaptische Gephyrin-Cluster können somit über eine Co-Lokalisation mit VGAT identifiziert werden. Wie bereits durch andere Arbeitsgruppen beschrieben, sind die größeren Gephyrin-Cluster in Synapsen lokalisiert, während sich kleinere Gephyrin-Aggregate meist außerhalb der Synapsen befinden (Maas et al., 2006). Speziell bei höherer Vergrößerung der Dendriten zeigte sich, dass PFN2a in hohem Maße in den größeren synaptischen Gephyrin-Clustern angereichert vorliegt (Abb. 3.10, D). Anhand dieser Aufnahmen ist außerdem zu erkennen, dass PFN2a in vielen Synapsen nahezu vollständig mit Gephyrin, aber nur partiell mit VGAT co-lokalisiert (Abb. 3.11 D, Pfeile). In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob PFN1 und PFN2a auch in „dendritic spines“, die die Mehrheit exzitatorischer Postsynapsen beinhalten, unterschiedlich lokalisieren.

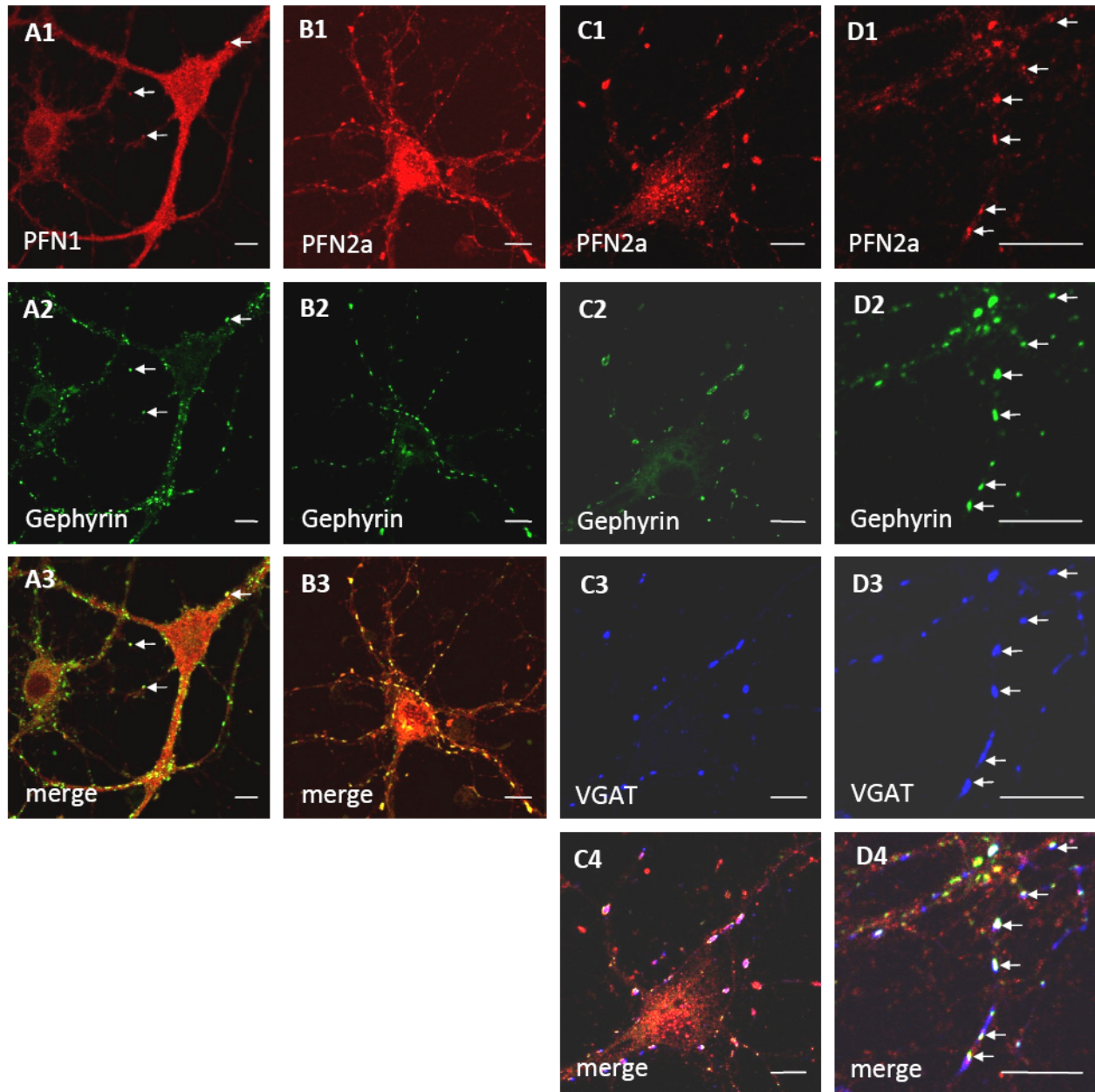


Abb. 3.10: Co-Lokalisation von Profilin 2a mit synaptischen Gephyrin-Clustern

In dissoziierten murinen Neuronen wurden PFN1 oder PFN2a mit den Antikörpern 2C5 bzw. 4H5 (rot) zusammen mit Gephyrin (grün), das über den monoklonalen Antikörper 3B11 nachgewiesen wurde, dargestellt. (A, B). Die Markierung der Profilin-Antikörper erfolgte über Cy3-gekoppelte anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper. Der anti-Gephyrin Antikörper 3B11 wurde mittels Alexa488-konjugierter Zenon-Fab-Fragmente markiert. Zur Darstellung synaptischer Gephyrin-Cluster wurde neben PFN2a (rot) und Gephyrin (grün) auch VGAT (blau) durch ein spezifisches Antiserum und Cy5-gekoppelte anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper gefärbt (C, D.). Die Analysen erfolgten per konfokaler Mikroskopie (Balken: 10µm). Pfeile weisen in Ansatz A auf vereinzelte PFN1-Anreicherungen in Gephyrin-Clustern hin. In Ansatz D sind Synapsen mit überwiegend postsynaptisch lokalisiertem PFN2a durch Pfeile markiert.

3.2.4 Lokalisation von Profilin 1 und 2a in „dendritic spines“

Da insbesondere für exogenes GFP-fusioniertes PFN2a eine aktivitätsabhängige Translokation in „dendritic spines“ beschrieben worden ist (Ackermann & Matus, 2003), wurde in folgenden Experimenten mittels Antikörpern untersucht, ob auch die endogenen Profileine eine solche Lokalisationsänderung erfahren. Für die Untersuchung des endogenen PFN1 und PFN2a in „dendritic spines“ wurden kultivierte Ratten-Neurone eingesetzt, weil diese Zellen eine höhere Dichte von „dendritic spines“ (s. Einleitung) als kultivierte Maus-Neuronen aufweisen. Profileine von Ratte und Maus sind nahezu identisch (siehe Tab. 3.3.). Bereits bei ersten Experimenten, in denen PFN1 und PFN2a in nicht stimulierten Ratten-Neuronen gefärbt wurden, fiel eine differenzielle Lokalisation der Profilin-Isoformen in den Neuriten auf (Abb. 3.11).

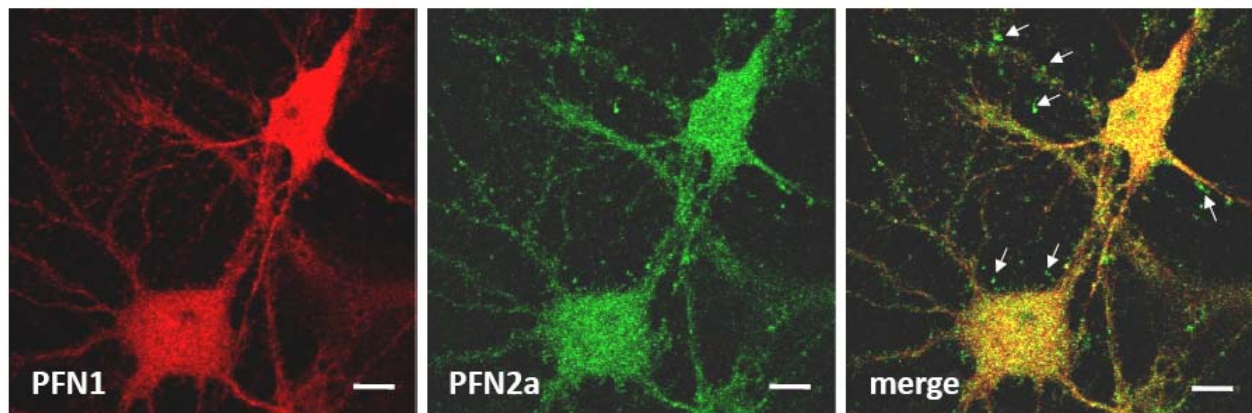


Abb. 3.11: Differenzielle Lokalisation von Profilin 1 und 2a in Neuriten

In dissoziierten Ratten-Neuronen (DIV14) wurde PFN1 (rot) und PFN2a (grün) gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (Balken: 10 μ m). Die Darstellung von PFN1 erfolgte mithilfe des 2C5-Antikörpers und Cy3-gekoppelter anti-Maus Sekundärantikörper. PFN2a wurde über den Antikörper 4H5 gefärbt, der zuvor mit Alexa488-konjugierten Zenon-Fab-Fragmenten markiert wurde.

PFN1 ist wie in murinen Neuronen überwiegend homogen in den Neuriten verteilt, während PFN2a in Form distinkter Strukturen die Neuriten dekoriert (Abb. 3.11, Pfeile). Diese Strukturen lassen eine Lokalisation von speziell endogenem PFN2a in „dendritic spines“ vermuten. Für einen direkten Nachweis von PFN1 und PFN2a in „dendritic spines“ war entweder eine Färbung mit Markern für excitatorischen Synapsen oder eine Visualisierung der gesamten Dendriten-Morphologie notwendig. Eine Färbung von Proteinen der excitatorischen PSD (s. Einleitung) in Kombination mit Profilin war nicht möglich, da die hierfür notwendige Methanol-Fixierung nicht mit den Profilin-Antikörpern kompatibel ist. Stattdessen wurde die Morphologie der „dendritic spines“ in hippocampalen Ratten-Neuronen mit Membran gebundenem, farnesylisiertem GFP (GFP-F) dargestellt und anschließend mit PFN1 bzw. PFN2a

spezifischen Antikörpern gefärbt. Um einen hohen Stichprobenumfang bei der Quantifizierung Profilin-positiver „dendritic spines“ zu erreichen, wurden die Neurone von Nina Wittenmayer (Universität Heidelberg) mit dem Vektor FUGW(Syn)GFP-F über Lentiviren transfiziert. Aufgrund des Synapsin-Promotors exprimierten nur Neurone, nicht die co-kultivierten Glia-Zellen GFP-F. Analog zu publizierten Überexpressionsexperimenten mit PFN2a-GFP wurde ein Teil der Kulturen mit NMDA stimuliert (Ackermann & Matus, 2003). Umgehend nach der Stimulierung wurden die Zellen fixiert und jeweils PFN1 oder PFN2a mit den Antikörpern 2C5 und 4H5 gefärbt. Die Anzahl Profilin-positiver „dendritic spines“ wurde anhand konfokaler Detailaufnahmen der Dendriten bestimmt (Abb. 3.12).

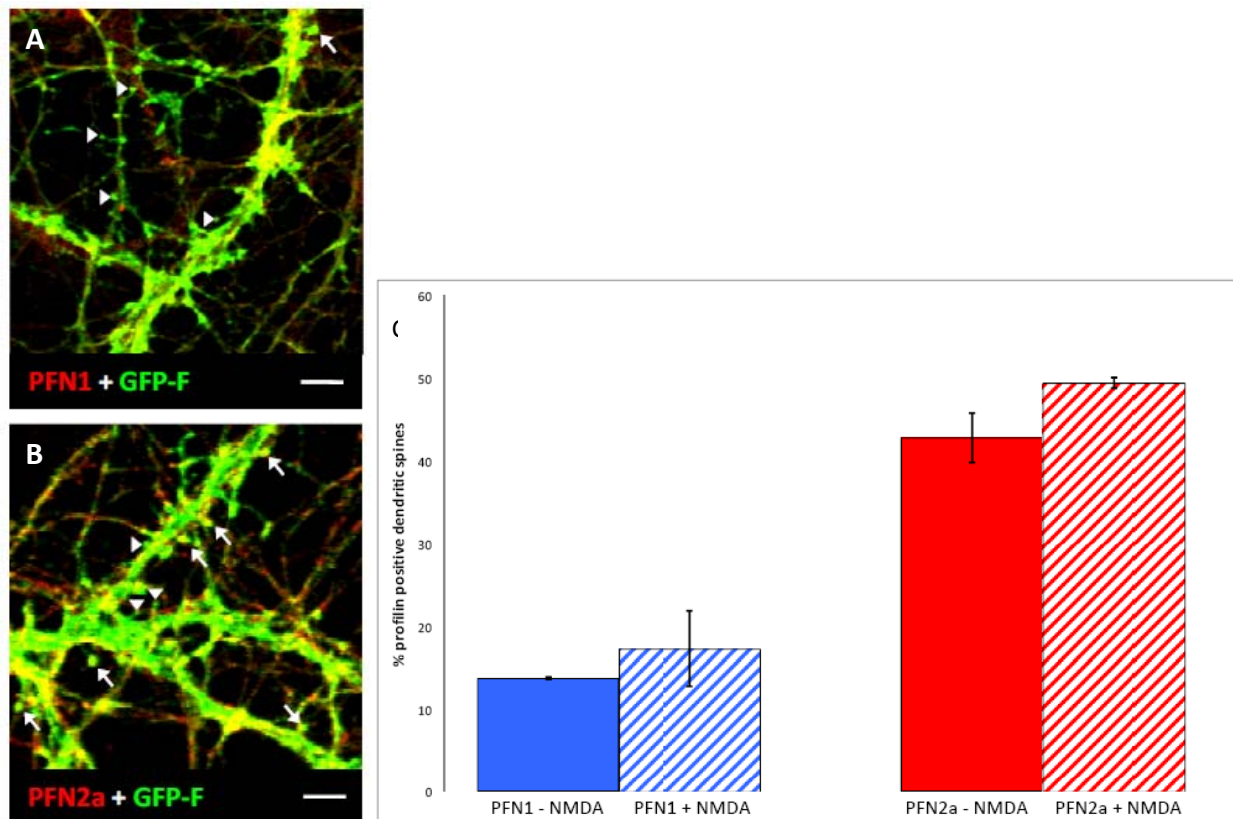


Abb. 3.12: Differenzielle Lokalisation von Profilin 1 und Profilin 2a in „dendritic spines“

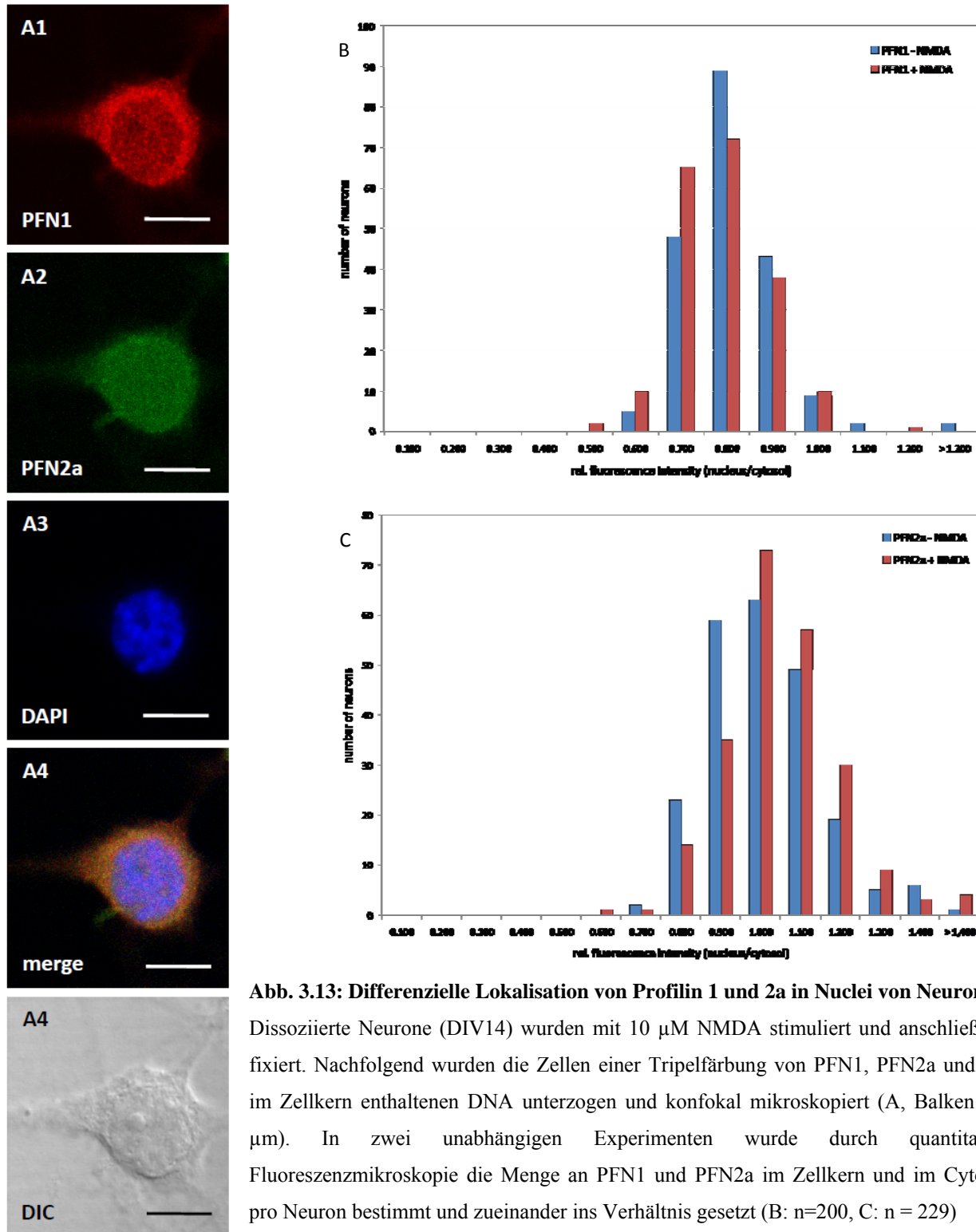
Dissoziierte Neurone wurden nach vier Tagen in Kultur mit dem Konstrukt FUGW(Syn)GFP-F, das für das membranständige Reportergen GFP-F codiert, lentiviral transfiziert. Nach zehn weiteren Tagen in Kultur wurde die Hälfte der Ansätze mit 10 μ M NMDA stimuliert, fixiert, und mit Antikörpern gegen PFN1 (A) oder PFN2a (B) gefärbt. In den repräsentativen Bildausschnitten sind durch die Überlagerung der Einzelaufnahmen gelb gefärbte und somit Profilin-positiv „dendritic spines“ durch Pfeile markiert. Pfeilspitzen markieren Profilin-negative „dendritic spines“ (Balken: 5 μ m). Anhand konfokaler Aufnahmen wurde in zwei unabhängigen Experimenten aus je 25 Sichtfeldern (durchschnittliche Fläche: 120*120 μ m) die Anzahl Profilin-positiver „dendritic spines“ ohne bzw. nach NMDA-Stimulation bestimmt (C, mindestens 1307 „dendritic spines“ pro Ansatz, statistische Auswertung mittels Student-Test (t-Test), $p < 0,05$).

Entgegen der Resultate von Ackermann & Matus (2003) konnte durch quantitative Fluoreszenzmikroskopie keine Akkumulation des endogenen Profilins in den Köpfen der „dendritic spines“ beobachtet werden, die den Gehalt des Profilins in den Dendriten übertraf. Daher wurden „dendritic spines“ als „Profilin-positiv“ gewertet, wenn diese in der Überlagerung der GFP-F- und Profilin-Kanäle eine deutliche Gelbfärbung aufwiesen.

Ohne Stimulation der NMDA-Rezeptoren ist PFN1 in ca. 13% der „dendritic spines“ präsent. Erfolgte eine Inkubation mit 10 μ M NMDA, so erhöhte sich die Anzahl PFN1-positiver „dendritic spines“ auf ca. 17% (Abb. 3.12, C). Allerdings sind die durch die NMDA-Stimulation erhaltenen Unterschiede in der PFN1-Lokalisation statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz zu PFN1 ist PFN2a bereits unter ruhenden Bedingungen in ca. 42% der „dendritic spines“ zu finden. Eine Stimulation der NMDA-Rezeptoren erhöhte den Anteil PFN2a-positiver „dendritic spines“ auf nahezu 50% (Abb. 3.12, C). Die statistische Auswertung ergab jedoch, dass auch in diesen Experimenten der Anstieg der PFN2a-Lokalisation in den „dendritic spines“ nicht signifikant ist. Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Profilin-Antikörpern konnte somit erstmals die differenzielle Lokalisation von endogenem PFN1 und PFN2a in „dendritic spines“ nachgewiesen werden. Analog zu den Experimenten in inhibitorischen Synapsen wurde gezeigt, dass in Profilin-positiven „dendritic spines“ überwiegend PFN2a enthalten ist. Eine Aktivierung der NMDA-Rezeptoren war mit nur geringen Veränderungen in der Lokalisation von endogenem PFN1 und PFN2a verbunden. Da auch eine NMDA-Rezeptor-abhängige Akkumulation von exogenem PFN2a in den Zellkernen von Neuronen beschrieben worden ist (Birbach et al., 2006), wurde weiterhin untersucht, ob die endogenen Profilin-Isoformen abhängig von neuronaler Aktivität in Nuclei translozieren.

3.2.5 Lokalisation von Profilin 1 und 2a in Nuclei hippocampaler Neurone

Gemäß der Angaben von Birbach und Mitarbeitern (2006) wurden dissoziierte hippocampale Ratten-Neurone nach 14 Tagen Kultivierung für 30 Minuten mit 10 μ M NMDA inkubiert. Da die Translokation des exogenen Profilins als äußerst schnell und reversibel beschrieben ist, wurden die Zellen unmittelbar nach der NMDA-Behandlung mit Paraformaldehyd fixiert und für fluoreszenzmikroskopische Analysen mit den Antikörpern 2C5 und 4H5 sowie DAPI gefärbt (Abb. 3.13 A). Für eine vergleichende Quantifizierung des Profilin-Gehalts wurden die gefärbten Neurone konfokal mikroskopiert und anschließend die durchschnittliche Fluoreszenzintensität des Profilins im Kern und Cytosol gemessen. Diese Werte wurden ins Verhältnis gesetzt und in Form von Histogrammen dargestellt (Abb. 3.13, B und C).



PFN1 ist in den Zellkernen der Neurone wie bei den bereits zuvor untersuchten C2C12-Zellen in distinkten Strukturen vorhanden (vgl. Abb. 3.7). Allerdings scheint auch in Neuronen der Anteil von PFN1 im Zellkern geringer zu sein als im Cytoplasma (Abb. 3.13 A1).

Im Gegensatz zu PFN1 tendiert endogenes PFN2a unter nicht stimulierten Bedingungen zu einer homogenen Verteilung in den Zellkernen (Abb. 3.13 A2). Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale ergab, dass im Vergleich zu PFN1 PFN2a in höherem Maße in Zellkernen von Neuronen lokalisiert. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass die PFN2a-Konzentrationen in Nuclei und Cytosol nahezu gleich sind (Abb. 3.13 C). Eine NMDA-Behandlung der Neuronen erbrachte praktisch keine Veränderungen des PFN1-Anteils in den Nuclei der Neurone (Abb. 3.13, B), während sich der Gehalt von PFN2a in den Zellkernen sich nur in geringem Maße erhöhte (Abb. 3.13, C). Analog zu der Profilin-Lokalisation in „dendritic spines“ konnten endogenes PFN1 und PFN2a bereits in den Zellkernen nicht-stimulierter Neurone nachgewiesen werden. Die Stimulation der NMDA-Rezeptoren hatte nur marginale Konsequenzen auf die Verteilung der endogenen Profiline.

3.2.6 Expression und Lokalisation von Profilin 1 und 2a in Gliazellen

In den angelegten Hippocampus-Kulturen der Ratte waren neben Neuronen auch stets Zellen co-kultiviert, die sich aufgrund der Morphologie deutlich von Neuronen unterschieden, die aber ebenfalls PFN 2a exprimierten und im Zellkern anreicherten. (Abb. 3.14, A). Aufgrund folgender Kriterien wurden sie als Gliazellen vom Typ Ependymzellen identifiziert: sie zeigten eine epitheliale Morphologie, in manchen Fällen verbunden mit der Ausprägung eines epithelialen, von Aktinfilamentbündeln gebildeten Adhäsionsgürtels, sie waren negativ für das glial fibrillar acidic protein GFAP (Färbung nicht gezeigt). Ependymzellen stellen einen sehr heterogenen Subtypus der Gliazellen dar. Sie bauen im Organismus ein hochprismatisches Epithel auf, das als Blut-Hirn-Schranke die übrigen neuronalen Zellen abschirmt und hochspezifisch den Stoffaustausch zwischen den Geweben reguliert (Gabrion et al., 1998). Mit den verwendeten Antikörpern konnte PFN2a erstmals in einem Gliazelltyp nachgewiesen und gezeigt werden, dass hier diese Isoform hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Außerdem konnte in der Immunfluoreszenz PFN1 praktisch nicht nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Doppelfärbungen von PFN2a und F-Aktin weisen daraufhin, dass die nukläre Akkumulation von PFN2a praktisch nur in einer Population von Ependym-Zellen auftritt, die (noch) keinen ausgeprägten Adhäsionsgürtel besitzen (Abb. 3.14, B, C). Ependym-Zellen mit einem vollends ausgebildeten Aktin-Adhäsionsgürtel enthielten nur sehr wenig PFN2a, das außerdem homogen im Cytosol verteilt ist (Abb. 3.14, D). Weiterführende Studien zu einer möglicherweise differenzierungsabhängigen PFN2a-Lokalisation in Ependym-Zellen waren nicht möglich, da für diese Zellen keine entsprechenden spezifischen Marker bekannt sind (Schnitzer et al., 1981; Gabrion et al., 1998, Steiner et al., 2007).

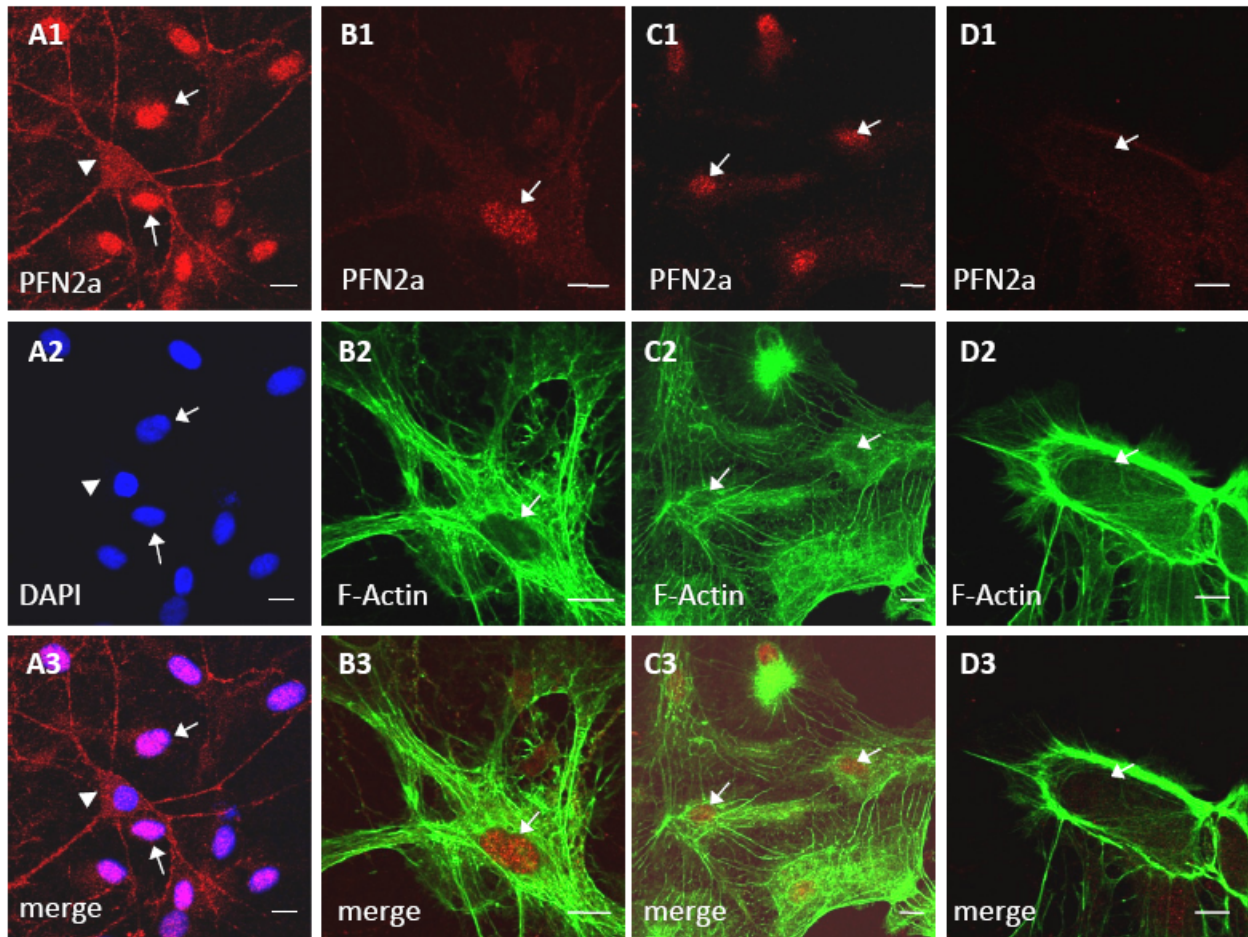


Abb. 3.14: Profilin 2a lokalisiert in Nuclei von Ependym-Zellen

Konfokale Aufnahmen primärer Zellen, die aus Ratten-Hippocampi isoliert, kultiviert und mit dem PFN2a-spezifischen Antikörper 4H5 (rot) und DAPI (blau) gefärbt wurden (A). PFN2a ist im Soma und Zellkern von Neuronen (Pfeilspitze) gleichmäßig verteilt, während PFN2a in Nuclei co-kultivierter Ependym-Zellen (Identifizierung siehe Text) konzentriert ist (Pfeile). Darstellung der Kernlokalisierung von PFN2a (rot) in Abhängigkeit der Aktin-Organisation der Ependym-Zellen (B-D). Aktin-Filamente (grün) wurden unter Verwendung von Phalloidin-FITC gefärbt. Zu beachten ist, dass PFN2a in den Zellkernen von Ependym-Zellen akkumuliert, die keinen Adhäsionsgürtel aus Aktin-Filamenten besitzen (B, C). PFN2a wird in Ependym-Zellen mit vollends ausgebildetem Adhäsionsgürtel auf niedrigem Niveau exprimiert und lokalisiert nicht in den Zellkernen (D). Zellkerne der Ependym-Zellen sind in Abb. B-D durch Pfeile hervorgehoben (Balken: 10 µm).

Der Nachweis der Expression von PFN2a in Ependym-Zellen warf jedoch die Frage auf, inwieweit die Profilin-Isoformen 1 und 2a auch in anderen Gliazell-Typen, wie Astrocyten und Oligodendrocyten exprimiert werden. Astrozyten sind Gliazellen, die im ZNS vielfältige Funktionen, wie z.B. die Regulation der Homöostasis, die Versorgung von Neuronen mit Nährstoffen, Synaptogenese und Modulation reifer Synapsen übernehmen und ebenfalls mit hippocampalen Neuronen co-kultivierbar sind.

Die Untersuchung von PFN1 und PFN2a in Astrocyten erfolgte anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen mit den Profilin-spezifischen Antikörpern sowie einem Antiserum, durch das spezifisch das in Astrocyten exprimierte „glial fibrillary acidic protein (GFAP) nachgewiesen wird (Abb. 3.15).

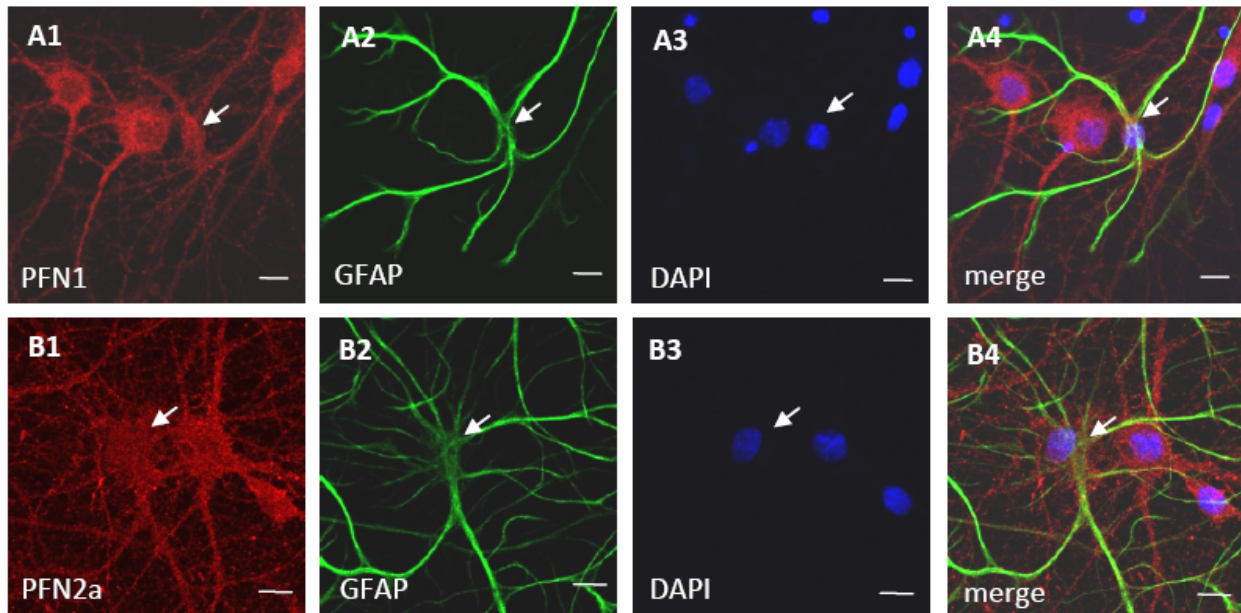


Abb. 3.15: Darstellung von Profilin 1 und 2a in Astrocyten

PFN1 (A, rot) und PFN2a (B, rot) wurden jeweils in Kombination mit dem Astrocyten-Marker GFAP (grün) gefärbt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mittels DAPI (blau) angefärbt. Die Aufnahmen wurden unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops erzielt (Balken: 10 µm). Die Pfeile markieren in beiden Bildreihen einen Astrocyten-Zellkörper.

Im Gegensatz zur differenziellen Lokalisation von PFN1 und PFN2a in Neuronen sind beide Profilin-Isoformen in Astrocyten homogen verteilt.

Als dritter Gliazelltyp des Rattenhippocampus wurden Oligodendrocyten analysiert. Diese Zellen modulieren im ZNS die saltatorische Erregungsleitung von Neuronen durch den Aufbau von Myelinscheiden. Die Identifizierung von Oligodendrocyten erfolgte durch die Färbung des Transkriptionsfaktor Olig2. Dieses Markerprotein wird bereits früh in Oligodendrocyten-Vorläuferzellen exprimiert und ist in allen Differenzierungsstadien der Oligodendrocyten im Zellkern lokalisiert (Zhou et al., 2000). Abb. 3.16 zeigt, dass beide Profilin Isoformen in Oligodendrocyten vorkommen. PFN1 lokalisiert annähernd homogen entlang der Ausläufer, während PFN2a vorwiegend distinkt in Vesikel-ähnlichen Strukturen im Zellkörper angereichert ist (Abb. 3.15).

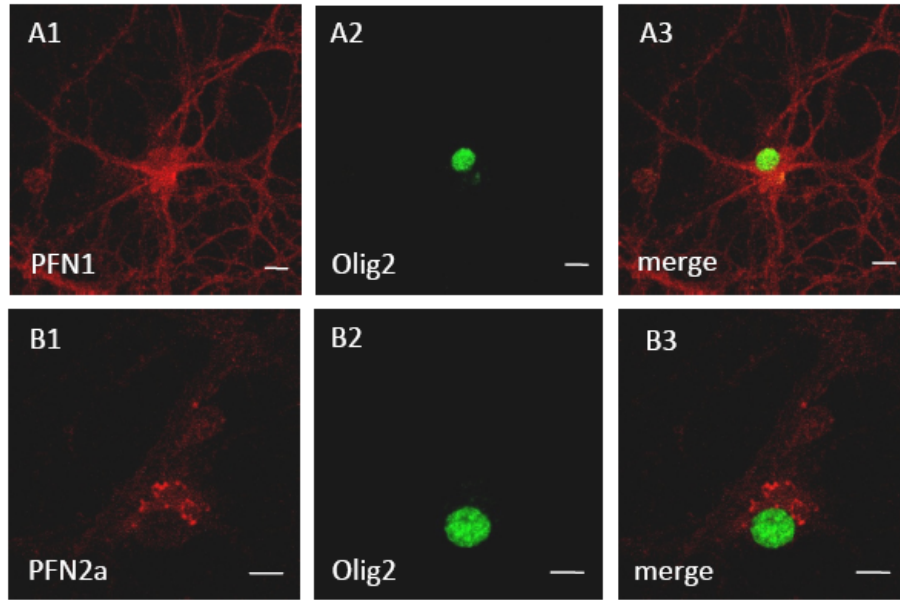


Abb. 3.16: Profilin-Lokalisation in hippocampalen Oligodendrocyten

PFN1(A, rot) oder PFN2a (B, rot) wurden jeweils in Kombination mit dem Oligodendrocyten-spezifischen Marker Olig2 (grün) gefärbt und konfokal mikroskopiert (Balken: 10 μm).

Folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Profilin-Expression und –Lokalisation in den untersuchten Gliazellen zusammen:

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Analysen von Profilin 1 und Profilin 2a in Gliazellen

Zelltyp	PFN1 Expression	PFN1 Lokalisation	PFN2a Expression	PFN2a Lokalisation
Ependymzellen	-		+	abhängig von Wuchsform: ohne Adhäsionsgürtel: in Nuclei mit Adhäsionsgürtel: cytoplasmatisch
Astrocyten	+	Homogen cytoplasmatisch	+	Homogen cytoplasmatisch
Oligodendrocyten	+	Homogen cytoplasmatisch	+	Akkumulation in Vesikel-ähnlichen Strukturen innerhalb des Somas

3.3 Analyse der funktionellen Diversität von Profilin 1 und 2a mittels eines „Knock down & Knock in“-Vektor-Systems

Die in den fluoreszenzmikroskopischen Studien nachgewiesene differenzielle Lokalisation von PFN1 und PFN2a stützt die Hypothese einer funktionellen Diversität dieser Profilin-Isoformen in Neuronen. Daher sollten in dieser Arbeit weiterführende funktionelle Analysen in Neuronen durchgeführt werden, die auf der Inhibition der Genexpression von PFN1 und PFN2a per RNA-Interferenz (RNAi) basieren. Hierfür war es zunächst erforderlich ein für Neuronen geeignetes RNAi-System zu etablieren.

3.3.1 Plasmid gestützte RNA-Interferenz von Profilin 1 und 2a

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um einen epigenetischen Mechanismus, über den in fast allen Eukaryonten spezifisch die Expression einzelner Gene verhindert werden kann (Hannon, 2002). Die Basis dieses Mechanismus bilden kleine „small interfering RNAs (siRNAs)“, die durch die Enzyme Drosha und Dicer aus längeren Transkripten generiert werden (Meister & Tuschl, 2004). Die siRNAs werden anschließend in einen Nuclease-Komplex, den „RNA induced silencing complex (RISC)“ inkorporiert, über den spezifisch mRNAs degradiert werden (Filipowicz, 2005).

Für die Inhibition der Genexpression in Mammalia werden häufig synthetische „small interfering RNAs“ (siRNAs) eingesetzt (Elbashir et al., 2001). Da sich die für die Degradation von mRNA verantwortliche RNAi-Maschinerie im Cytosol befindet, können diese synthetischen 21-23 nt langen RNA-Moleküle mit extrem hoher Transfektionseffizienz in kultivierte Zellen eingebracht werden (Gilmore et al., 2006). Von primären Neuronen ist allerdings bekannt, dass unter Umständen die Transfektion mit siRNAs ein erhöhtes Zellsterben zur Folge haben kann (Krichevsky & Kosik, 2002). Zudem ist es problematisch, über einen längeren Zeitraum transfizierte Zellen *in vivo* nachzuweisen.

Alternativ können Plasmid-gestützte RNAi-Systeme verwendet werden, über die „short hairpin-RNAs“ (shRNAs) oder „microRNAs“ (miRNAs) in den Zellen produziert werden. Diese haarnadelähnlichen RNA-Moleküle werden in den transfizierten Zellen zu siRNAs prozessiert. Für die Analysen von Profilin in Neuronen wurde mit dem Vektor pRNAT U6.3/Hygro der Firma Genscript (Piscataway, New Jersey, USA) ein solches RNAi-System eingesetzt (Abb. 3.17).

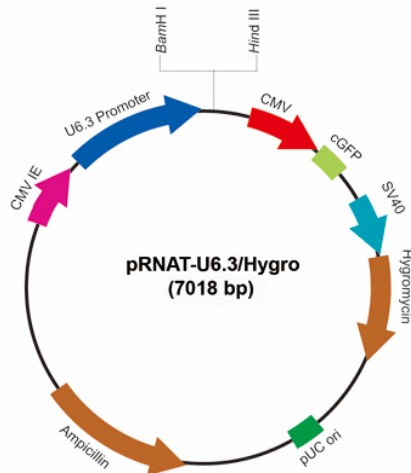


Abb. 3.17: Schema des Vektors pRNAT-U6.3/Hygro

In den RNAi-Vektor pRNAT-U6.3/Hygro können genspezifische shRNA-Sequenzen inseriert werden, die über einen CMV-Enhancer (rosa) verstärkten U6-Promoter (blau) transkribiert werden. Dieser Vektor codiert für GFP (grün), das unter der Kontrolle eines CMV-Promoters (rot) steht. Stabil transfizierte Zellen können aufgrund eines Hygromycin-Resistenzgens (braun) selektiert werden.

Der Vektor pRNAT U6.3 besitzt folgende Spezifikationen: Die Transkription von genspezifischen shRNAs erfolgt in diesem Vektor über einen humanen U6-Promotor, der zusätzlich durch einen CMV-Enhancer verstärkt ist. Transfizierte Zellen können durch die Expression des Reportergens GFP identifiziert werden, das unter der Kontrolle eines CMV-Promoters steht. Zusätzlich können durch eine Hygromycin-Resistenz stabile Klone von Zelllinien generiert werden, in denen das Zielgen konstitutiv in seiner Expression gehemmt ist. Unter Verwendung von im Internet zugänglichen Algorithmen der Firmen Genscript, Sigma-Aldrich und Invitrogen wurden mPFN1 und mPFN2a-spezifische shRNA-Sequenzen ermittelt (Internetadressen im Anhang). Die *in silico*-Vorhersage ergab zwölf PFN1-spezifische shRNA-Sequenzen. Für mPFN2a konnten 19 potenziell funktionelle shRNA-Sequenzen ermittelt werden. Diese shRNA-Sequenzen, die gegen verschiedene Bereiche der codierenden Region von mPFN1 oder mPFN2a gerichtet sind, wurden in Form synthetischer Oligonukleotide in den Vektor pRNAT U6.3/Hygro kloniert. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pRNAT-U6.3 siFluc verwendet, durch den eine Luciferase-spezifische shRNA produziert wird (Lewis et al., 2002). Zunächst galt es herauszufinden, ob die generierten RNAi-Konstrukte effektiv die Expression von PFN1 bzw. PFN2a inhibieren können.

3.3.2 Identifikation funktioneller shRNA-Sequenzen für den Isoform-spezifischen Knock down von Profilin 1 und 2a

Die effiziente Inhibition eines Zielgens per RNAi kann über die Analyse des Gehaltes an endogenem Transkript oder Protein ermittelt werden. Diese Analysen erfordern allerdings eine extrem hohe Transfektionsrate sowie die Kenntnis der Halbwertszeit des zu untersuchenden Proteins. Im Gegensatz zu synthetischer siRNA, die nur die Plasmamembran der Zelle zu überwinden braucht, ist eine nahezu vollständige nichtvirale Transfektion der meisten Mammalia-Zelltypen mit Plasmid-DNA kaum zu erreichen.

Zwar können prinzipiell über den in Kapitel 3.3.1 vorgestellten Vektor stabil transfizierte Zellklone etabliert werden. Jedoch ist dies bei den Zielgenen dieser Arbeit nicht möglich: PFN1 scheint für die Zellproliferation essentiell zu sein, während PFN2a in Mammalia nur im ZNS exprimiert wird (Ding et al., 2006; Witke et al., 2001). Anstelle direkter Analysen der endogenen Profilin-Gehalte wurden funktionelle shRNA-Sequenzen zunächst über Co-Transfektionen der RNAi-Vektoren mit Profilin-Expressionsvektoren in HeLa-Zellen ermittelt. Diese Experimente basieren auf folgendem Funktionsprinzip: Die verwendeten Expressionsvektoren codieren für Profiline mit einem „Birkenprofilin (Bipro)-Epitop-tag“ oder mit einem YFP-Fusionsanteil (Rüdiger et al., 1997). Über den Nachweis des Bipro- bzw. des YFP-Fusionsanteils kann in Western Blot-Analysen die Expression exogener Profiline separat vom endogenen Profilin der HeLa-Zellen untersucht werden. Für die Identifikation funktioneller shRNA-Sequenzen hat diese Vorgehensweise den Vorteil, dass die Halbwertszeit des endogenen Zielproteins nicht berücksichtigt werden muss, da die *de novo*-Expression des exogenen Profilins gleichzeitig mit der Produktion der shRNAs erfolgt. Im Falle einer funktionellen shRNA kann in HeLa-Zellen folglich kaum exogenes Profilin gebildet werden, da dessen mRNA umgehend über die RNAi-Maschinerie degradiert wird. Bei nicht funktionellen shRNAs erfolgt dagegen ungestört die Expression des exogenen Profilins. Mit diesem artifiziellen System ist es außerdem möglich, den Grad der RNA-Interferenz von Zielgenen zu bestimmen, die wie PFN2a in Zellen exprimiert werden, die nur mit geringer Effizienz mit Plasmid-DNA transfiziert werden können.

Aus insgesamt 12 Vektoren mit PFN1-spezifischen shRNA-Sequenzen (pRNAT1.1-1.12) konnte einzig das Plasmid pRNAT1.3 effizient die Expression von exogenem Bipro-mPFN1 hemmen (Abb. 3.18 A). In einem analogen Experiment konnte dieses Konstrukt die Expression von exogenem YFP-mPFN2a nicht inhibieren (Abb. 3.18 B). Somit wurde gezeigt, dass der Vektor pRNAT 1.3 Isoform-spezifisch einen Knock down von PFN1 bewirkt. Ein weiterer Beleg für eine RNAi-bedingte Inhibition der PFN1-Expression ist das Ergebnis eines Co-Transfektionsexperimentes, in dem ein Expressionsvektor mit einer synthetischen hPFN1-cDNA verwendet wurde (Abb. 3.18 C). Diese synthetische cDNA ist mit einer Vielzahl stiller Mutationen versehen, durch die gegen endogenes Profilin-Transkript gerichtete siRNAs keine Degradation der exogenen mRNA bewirken können (Rosan, 2007). Wie bei der Co-Transfektion mit dem PFN2a-Expressionsvektor ist in diesem Experiment der Grad der exogenen Profilin-Expression zwischen den Ansätzen mit dem RNAi-Vektor pRNAT 1.3 und dem Kontrollvektor pRNAT siFluc vergleichbar.

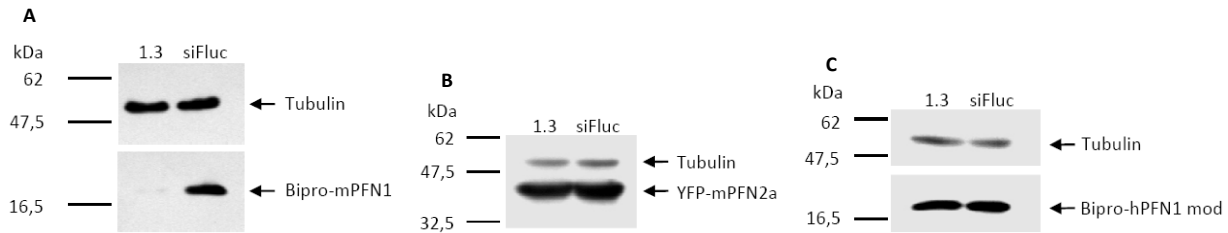


Abb. 3.18: Western Blot-Analyse von HeLa-Zellen nach Co-Transfektion mit dem PFN1-spezifischen RNAi-Vektor pRNAT 1.3 und Profilin-Expressionsvektoren

HeLa-Zellen wurden mit dem PFN1-spezifischen RNAi-Vektor pRNAT 1.3 bzw. dem Kontrollvektor pRNAT siFluc und Profilin-Expressionsvektoren co-transfiziert, nach 24 h geerntet, lysiert und in Western Blot-Analysen untersucht. Als Expressionsvektoren wurden pcDNA3-Bipro-mPFN1(A) und pEYFP-C2-mPFN2a (B) verwendet. Die Expression eines RNAi-resistenten hPFN1 wurde über den Vektor pcDNA3-Bipro-hPFN1 mod (C) erzielt. Der Nachweis der exogenen Profileine wurde im Western Blot mit einem GFP/YFP-spezifischen Antikörper bzw. dem anti-Bipro-Antikörper 4A6 durchgeführt. Der Tubulin-Nachweis über den Antikörper DM1α diente zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen. Der Vektor pRNAT 1.3 inhibiert spezifisch die Expression von PFN1.

Da die shRNA-Sequenzen zwischen mPFN1 und hPFN1 vollständig konserviert sind, wurde zusätzlich der negative Einfluss des Vektors pRNAT 1.3 auf die endogene PFN1-Expression von HeLa-Zellen untersucht. Hierfür wurden HeLa-Zellen auf Deckgläsern kultiviert, mit dem RNAi-Vektor pRNAT 1.3 transfiziert, nach verschiedenen Zeitpunkten fixiert und mit dem PFN1-spezifischen Antikörper 2H11 inkubiert (Abb. 3.19).

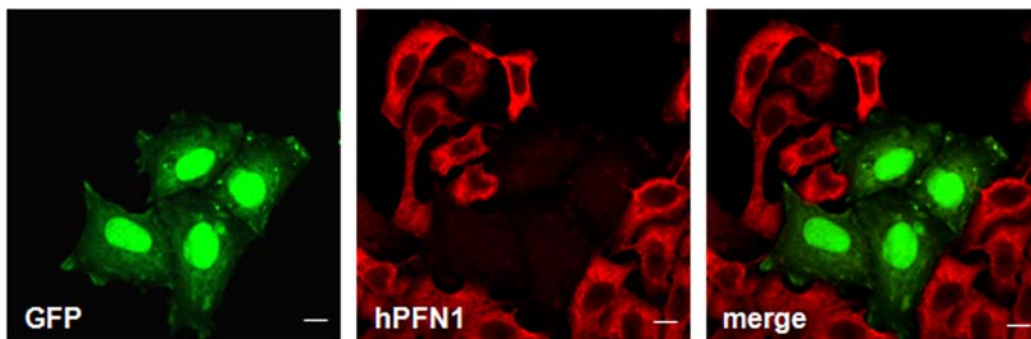


Abb. 3.19: Nachweis der RNA-Interferenz von endogenem Profilin 1 durch den RNAi-Vektor pRNAT 1.3

Endogenes hPFN1 wurde in HeLa-Zellen 96 h post Transfektion mit dem Vektor pRNAT 1.3 über den Antikörper 2H11 (rot) gefärbt. GFP-positive Zellen besitzen weitestgehend kein endogenes hPFN1 (Balken: 10 μm).

Spätestens 96 h nach Transfektion mit dem Vektor pRNAT 1.3 ist in GFP-positiven HeLa-Zellen der Großteil des endogenen Profilins nicht mehr nachweisbar. Neben HeLa-Zellen wurden von Kristin Michaelsen (TU-Braunschweig) kultivierte murine Hippocampus-Neurone mit diesem Vektor transfiziert. Allerdings führte dieser Vektor zum Absterben der transfizierten Neurone.

Es ist unklar, ob dies auf dem Verlust des Profilins zurückzuführen ist, oder die shRNA in den Neuronen zusätzlich unspezifische Nebeneffekte ausgelöst hat. Aufgrund des beobachteten letalen Phänotyps wurden mit dem RNAi-Vektor pRNAT 1.3 keine weiteren Analysen in neuronalen Zellen durchgeführt. Stattdessen wurde der Fokus auf die Konstruktion eines RNAi-Vektors zum Knock down von PFN2a in neuronalen Zellen gelegt. Für die Identifikation von funktionellen PFN2a-spezifischen RNAi-Vektoren wurde analog zu vorherigen Experimenten verfahren (Abb. 3.20). Wie für PFN1 konnte nur eine shRNA, pRNAT 2.13, ermittelt werden, die Isoform-spezifisch die Expression des exogenen YFP-mPFN2a inhibiert (Abb. 3.20, A, B). Diese shRNA kann zudem nicht die Expression eines exogenen PFN2a verhindern, das ebenfalls auf einer synthetischen cDNA mit stillen Mutationen basiert (Abb. 3.20, C).

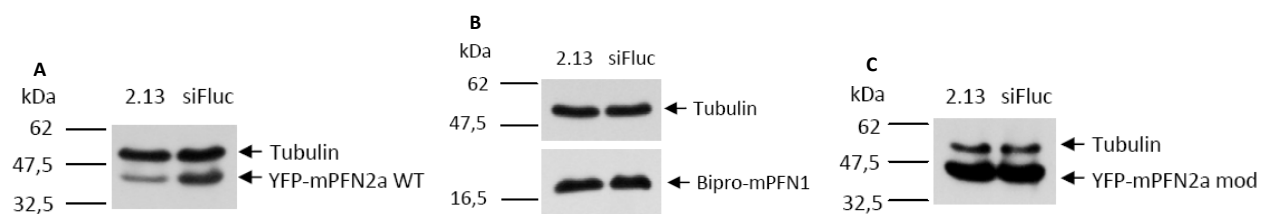


Abb. 3.20: Western Blot-Analyse von HeLa-Zellen nach Co-Transfektion mit PFN2a-spezifischen RNAi-Vektor und PFN2a-Expressionsvektoren

HeLa-Zellen wurden mit dem PFN2a-spezifischen RNAi-Vektor pRNAT 2.13 bzw. dem Kontrollvektor pRNAT siFluc und PFN2a-Expressionsvektoren co-transfiziert. Verwendet wurden pEYFP-C2-mPFN2a WT (A) und pcDNA3-Bipro-mPFN1 (B). Die Expression eines RNAi-resistenten PFN2a erfolgte über den Vektor pEYFP-C2-mPFN2a mod (C). Die Proteine wurden in den Western Blots mit den gleichen Antikörpern wie in Abb. 3.18 analysiert. Der Vektor pRNAT 2.13 führt zu einer Reduktion der Expression von PFN2a.

Für die Darstellung des Knock down von endogenem PFN2a wurden von Kristin Michaelsen (TU-Braunschweig) dissoziierte Maus-Neurone mit dem RNAi-Vektor pRNAT 2.13 transfiziert und nach verschiedenen Kultivierungszeiten fixiert. Durch Immunfluoreszenzfärbungen mit dem PFN2a-spezifischen Antikörper 4H5 wurde ermittelt, ob dieses RNAi-Konstrukt auch effektiv in Neuronen die Expression von PFN2a inhibiert (Abb. 3.21). Die Transfektion von Neuronen mit dem Vektor pRNAT 2.13 führte zu einem fast vollständigen Verlust von PFN2a. Dieser Effekt trat allerdings erst sieben Tage nach Transfektion ein. Demnach scheint PFN2a eine wesentlich längere Halbwertszeit als PFN1 zu besitzen. Im Gegensatz zu Neuronen, die mit dem PFN1-spezifischen RNAi-Vektor pRNAT 1.3 transfiziert wurden, zeigten die PFN2a-defizienten Neurone selbst über mehrere Wochen keinerlei Anzeichen erhöhter Letalität. Somit stand mit dem generierten PFN2a-spezifischen RNAi-Vektor pRNAT 2.13 ein geeignetes Werkzeug zur Verfügung, das die Grundlage für umfangreiche, funktionelle Analysen in neuronalen Zellen bildete.

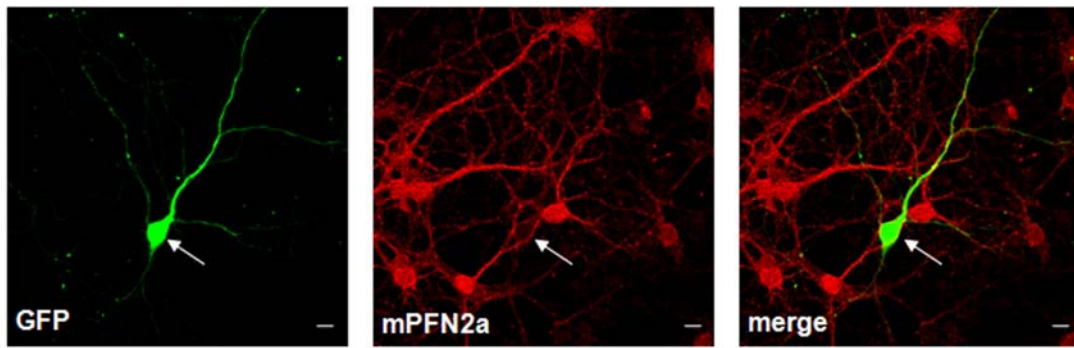


Abb. 3.21: Knock down des endogenen Profilin 2a in Neuronen nach Transfektion mit pRNAT 2.13

Dissoziierte Maus-Neurone (DIV14) wurden sieben Tage nach Transfektion mit dem Vektor pRNAT 2.13 mit dem PFN2a-spezifischen Antikörper 4H5 (rot) gefärbt und anschließend konfokal aufgenommen. In transfizierten Neuronen ist PFN2a praktisch nicht nachweisbar (Pfeil, Balken: 10 μ m).

3.3.3 Konstruktion von „Knock down & Knock in“-Vektoren

Seit die RNAi-Technik von Elbashir und Mitarbeitern (2001) erstmals in Mammalia-Zellen angewendet wurde, beschränkt sich die Anwendung von RNAi meist auf Experimente, in denen einzig die Expression von Genen verhindert wird. Allerdings wäre für viele Fragestellungen ein Verfahren hilfreich, durch das nicht nur endogene Zielgene ausgeschaltet, sondern gleichzeitig gegen andere Varianten wie Mutanten oder Isoformen ausgetauscht werden. Dies könnte auf der Basis eines RNAi-Vektorsystems wie dem pRNAT U6.3-Plasmid erfolgen: Anstelle eines Reportergens könnten cDNAs in den Vektor eingebracht werden, die für modifizierte cDNAs des zu untersuchenden Gens codieren. Folglich könnte mit einem einzigen Plasmid ein endogenes Protein durch RNAi ausgeschaltet und simultan durch eine exogene Variante substituiert werden. Ein solches „Knock down & Knock in“-System wäre aufgrund fehlender massiver genetischer Eingriffe weit weniger zeitintensiv als die Generierung von Gen-Deletionen und würde die gleichzeitige Analyse z.B. vieler verschiedener Mutationen ermöglichen. Außerdem könnte ein solches System dazu genutzt werden, durch exogene Expression des Wildtyp-Zielgens die Spezifität des beobachteten RNAi-Phänotyps zu verifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein solches System für die Analyse der zellulären Funktionen von PFN1 und PFN2a entwickelt. Aufgrund der einfacheren Handhabung von Zelllinien wurde das „Knock down & Knock in“-System zunächst auf der Basis des PFN1-spezifischen RNAi-Vektors pRNAT1.3 konstruiert und in HeLa-Zellen zum Einsatz gebracht.

Zuerst wurde durch ortsgerichtete Mutagenese zwischen dem Stop-Codon der GFP-cDNA und dem folgenden Polyadenylierungssignal des RNAi-Vektors pRNAT-U6.3 eine zusätzliche Schnittstelle für die Restriktionsendonuclease *ApaI* eingefügt. Über diese zusätzliche Schnittstelle kann die GFP-cDNA des RNAi-Vektors gegen andere cDNAs ausgetauscht werden, die für GFP-bzw. YFP-Fusionsproteine codieren (Abb. 3.22, A).

Auf diese Weise wurde in den PFN1-spezifischen RNAi-Vektor pRNAT1.3 eine cDNA inseriert, die für ein RNAi-resistentes YFP-Profilin 1 (YFP-hPFN1 mod) codiert. Anschließend wurde in fluoreszenzmikroskopischen Analysen überprüft, inwiefern der „Knock down & Knock in“-Vektor pRNAT1.3-YFP-hPFN1 endogenes hPFN1 in HeLa-Zellen herunter regulieren kann. Aufgrund der Verwendung von Antikörpern bestände bei solchen Analysen normalerweise das Problem, endogenes PFN1 und exogenes YFP-PFN1 getrennt voneinander nachzuweisen. Allerdings konnte bei der Analyse des „Knock down & Knock in“-Vektorsystems in HeLa-Zellen sowohl der Knock down des endogenen PFN1 als auch die Expression des YFP-hPFN1 spezifisch nachgewiesen werden, da das exogene YFP-hPFN1 aufgrund von N-terminal gelegenen Mutationen nicht von dem monoklonalen Antikörper 2H11 erkannt wird. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen demonstrieren (Abb.3.22), dass über einen einzelnen Vektor endogenes Profilin effektiv ausgeschaltet und gleichzeitig exogenes Profilin exprimiert werden kann.

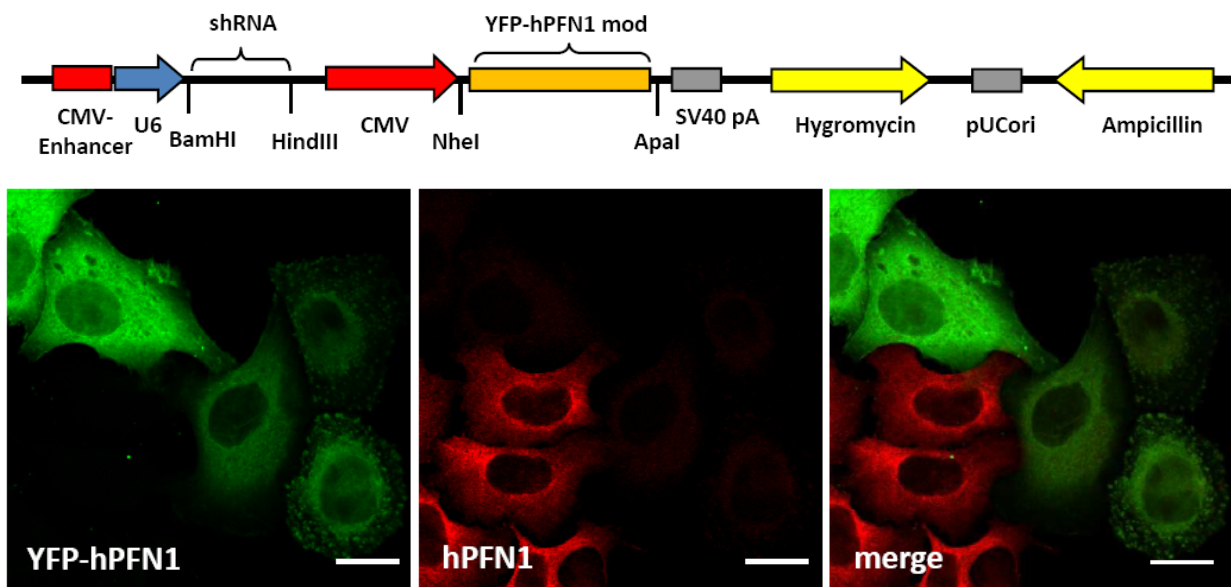


Abb. 3.22: Funktionalität eines Profilin 1-spezifischen „Knock down & Knock in“ in HeLa-Zellen

Linearisiertes Schema eines „Knock down & Knock in“- Vektors auf Basis des pRNAT U6.3-Vektors (vgl. Abb. 3.17). Die Expression der RNAi-resistenten YFP-hPFN1 mod-cDNA wird durch einen CMV-Promotor kontrolliert (A). Konfokale Aufnahmen von HeLa-Zellen 120 h nach Transfektion mit dem Vektor pRNAT 1.3 YFP-hPFN1. Endogenes hPFN1 wurde über den Antikörper 2H11 (rot) dargestellt. Das exogene YFP-hPFN1-mod wird nicht von dem hPFN1-spezifischen Antikörper 2H11 erkannt. YFP-hPFN1-positive Zellen exprimieren fast kein endogenes hPFN1 (Balken: 10 µm).

Allerdings wiesen die transfizierten Zellen im späteren Verlauf des Experiments eine erhöhte Letalität auf, die wahrscheinlich durch die CMV-Promoter-bedingte Überexpression des YFP-Profilins verursacht wird. HeLa-Zellen, in denen einzig PFN1 über den RNAi-Vektor pRNAT 1.3 ausgeschaltet wurde, konnten dagegen bis zu zehn Tage nach Transfektion kultiviert werden. Die Bestimmung der Apoptoserate von PFN1-defizienten HeLa-Zellen ergab, dass diese Zellen nicht zwangsläufig apoptotisch werden, sondern stattdessen die Proliferation einstellen (Hunecke, 2006). Dagegen trat bei HeLa-Zellen, die mit dem „Knock down & Knock in“-Vektor pRNAT1.3-YFP-hPFN1 transfiziert wurden, bereits nach 96 Stunden ein vermehrtes Zellsterben ein. Noch drastischer traten diese cytotoxischen Effekte in kultivierten Neuronen auf: Bereits eine 24-stündige, CMV-Promotor-abhängige Überexpression von YFP-hPFN1 bzw. YFP-mPFN2a bewirkte ein Absterben aller transfizierten Zellen.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass prinzipiell über ein einzelnes Plasmid der Knock Down von endogenem Profilin und die Expression einer exogenen Profilin-Variante gleichzeitig möglich ist. Angesichts der rasch eintretenden Cytotoxizität der Profilin-Überexpression und der erforderlichen Zeit bis zum Eintreten der RNA-Interferenz von PFN2a wurde allerdings auch deutlich, dass dieses „Knock down & Knock in“-Vektorsystem in dieser Form nicht in Neuronen einsetzbar ist.

Um dennoch ein „Knock down & Knock in“-Vektorsystem in weiterführenden Studien verwenden zu können, war es erforderlich, die Expression des exogenen Profilins erheblich zu drosseln. Basierend auf publizierten Promotorstudien wurden in pEYFP-C2-Vektoren drei der vier Enhancer-Kassetten des CMV-Promotors deletiert (Boshart et al., 1985). Diese daraus resultierenden Expressionsvektoren mit den RNAi-resistenten hPFN1- bzw. mPFN2a-cDNAs, pACMV-EYFP-hPFN1 mod und pACMV-EYFP-mPFN2a mod, wurden in hippocampale Neurone transfiziert. Über einen Zeitraum von zwei Wochen konnten derart transfizierte Neurone erfolgreich kultiviert werden (persönliche Mitteilung von Kristin Michaelen, (TU Braunschweig)).

Ausgehend vom Ergebnis dieser Überexpression-Experimente wurden die cDNAs für YFP-hPFN1 mod und YFP-mPFN2a mod samt deletiertem CMV-Promotor in den PFN2a-spezifischen RNAi-Vektor pRNAT 2.13 eingeführt (Abb. 3.23 A). Anschließend wurde der Wirkungsgrad dieser PFN2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Vektoren der zweiten Generation in Co-Transfektionsexperimenten analysiert (Abb. 3.23 B). Zum Nachweis des PFN2a-spezifischen Knock down in HeLa-Zellen wurde der Vektor pcDNA3-Bipro-mPFN2a verwendet. Über den anti-Bipro-Antikörper 4A6 wurde der Grad der PFN2a-Expression in den verschiedenen Ansätzen überprüft. Der Nachweis der YFP-Profiline bzw. des GFP erfolgte im Western Blot mittels eines GFP-spezifischen Antikörpers. Die Western Blot-Analysen ergaben, dass die „Knock down & Knock in“-Vektoren der zweiten Generation in vergleichbarem Maße wie der RNAi-Vektor 2.13 die Expression des exogenen Bipro-mPFN2a hemmen können.

Zugleich gelang mithilfe des GFP/YFP-spezifischen Antikörpers der Nachweis, dass über diese Vektoren anstelle des GFP RNAi-resistente YFP-Profiline gebildet wurden.

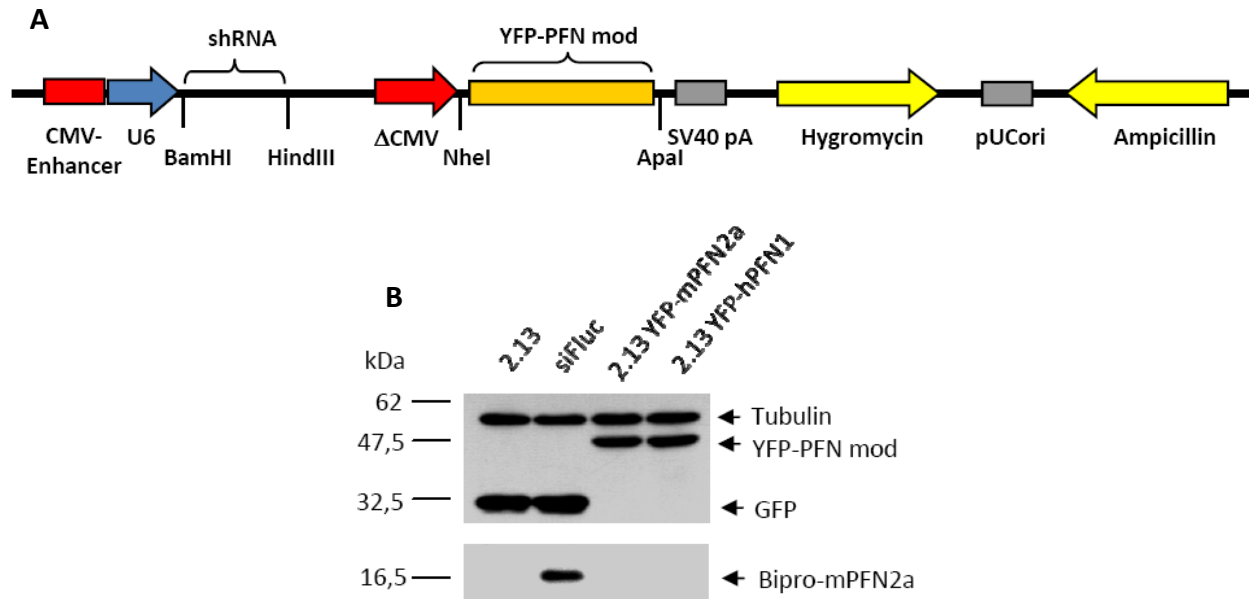


Abb. 3.23: Profilin 2a-spezifische „Knock down & Knock in“-Vektoren der zweiten Generation

Schematische Darstellung eines „Knock down & Knock in“-Vektors der zweiten Generation. Die Expression der RNAi-resistenten Profiline erfolgt über den deletierten CMV-Promotor (Δ CMV) (A, vgl. Abb. 3.17 & 3.22). Analyse der Funktionalität der PFN2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Vektoren (B). HeLa-Zellen wurden mit pcDNA3-Bipro-mPFN2a und jeweils dem Vektor pRNAT 2.13, pRNAT siFluc, pRNAT 2.13-YFP-mPFN2a oder pRNAT 2.13-YFP-hPFN1 co-transfiziert. Zum Nachweis des PFN2a-spezifischen Knock down wurde im Western Blot Bipro-mPFN2a mit dem Antikörper 4A6 nachgewiesen. Zudem wurden GFP und die RNAi-resistenten YFP-Profiline (YFP-PFN mod) mittels anti-GFP-Antikörper nachgewiesen. Der Tubulin-Nachweis über den Antikörper DM1 α fungierte als Beleg für gleichmäßig eingesetzte Proteinmengen in den verschiedenen Ansätzen.

Für weiterführende Untersuchungen wurden somit PFN2a-spezifische „Knock down & Knock in“-Vektoren der zweiten Generation verwendet, in denen der CMV-Promoter deletiert vorlag. Durch dieses „Knock down & Knock in“-System sollte analysiert werden, welche biochemischen Eigenschaften von PFN2a in neuronalen Prozessen von maßgeblicher Bedeutung sind. Hierfür war es zunächst erforderlich, entsprechende Mutationen im PFN2a-Molekül zu generieren und deren Auswirkung auf das Liganden-Bindungsverhalten von PFN2a zu untersuchen.

3.3.4 Generierung von Profilin 2a-Mutanten

Basierend auf der Struktur von PFN1 und PFN2a wurden Aminosäure-Reste in PFN2a für Mutationen ausgewählt, durch die nur einzelne Bindungsdomänen des Profilins ihre Funktion verlieren sollten (Nodelman et al., 1999; Kursula et al., 2008). Strukturvergleiche der Aktin-Bindungsdomäne von hPFN1 und mPFN2a deuten daraufhin, dass auch im PFN2a-Molekül wahrscheinlich die konservierten Aminosäuren Phenylalanin 59, Arginin 74 und 88 sowie Histidin 119 Schlüsselpositionen für die Interaktion mit G-Aktin darstellen (Abb. 3.24; Sohn et al., 1995; Korenbaum et al., 1998; Suetsugu et al., 1998; Schlüter et al., 1998; Lambrechts et al., 2002). Entsprechend wurden die Aminosäuren 59, 74 und 88 in PFN2a zur Generierung von Mutanten mit reduzierter G-Aktin-Bindung substituiert (siehe Tab. 3.2).

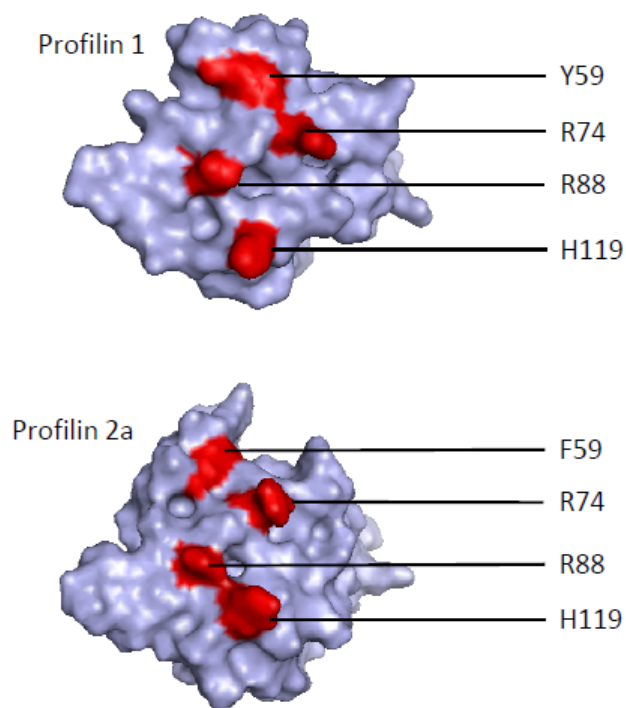


Abb. 3.24: Darstellung von Schlüsselpositionen der G-Aktin-Bindungsdomäne von Profilin 1 und 2a

Basierend auf Strukturdaten wurden mit dem Programm PyMol Oberflächenmodelle von hPFN1 und mPFN2a generiert (Fedorov et al., 1994; Kursula et al., 2008). Die Schlüsselpositionen für die G-Aktin-Bindung sind bei PFN1 und PFN2a konserviert (Aminosäure-Reste sind rot markiert).

Ein bedeutender Unterschied zwischen den Profilin-Isoformen 1 und 2a ist die höhere Affinität von PFN2a zu Poly-Prolin-Motiven (Lambrechts et al., 1995). Diese erhöhte Bindung ist bedingt durch eine umfangreicher ausgeprägte hydrophobe Region im Bereich des N- und C-Terminus von PFN2a (Abb. 3.25). Von PFN1 ist bekannt, dass der Histidin-Rest 133 eine zentrale Rolle bei der Bindung an Poly-Prolin-Motive einnimmt (Bjorkegren-Sjogren et al., 1997). Die Substitution des analogen Tyrosin-Restes 133 führt jedoch zu keiner ausreichenden Reduzierung der Poly-Prolin-Bindung von PFN2a (Bradatsch, 2001).

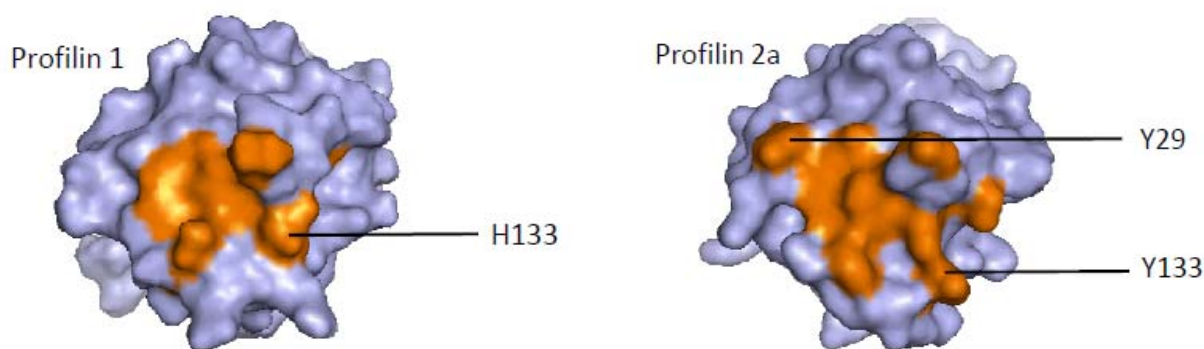


Abb. 3.25: Struktureller Vergleich der Poly-Prolin-Bindungsdomänen von Profilin 1 und Profilin 2a

Auf Basis der Strukturdaten von hPFN1 (links) und mPFN2a (rechts) wurden Oberflächenmodelle erstellt. Die an der Poly-Prolin-Bindung beteiligten Aminosäure-Reste sind orange hervorgehoben (Mahoney et al., 1997; Nodelman et al., 1999; Kursula et al., 2008). Im Vergleich zu PFN1 ist die hydrophobe Poly-Prolin-Bindungstasche von PFN2a umfangreicher ausgebildet. Der für die Poly-Prolin-Bindung von PFN1 essentielle Histidin-Rest 133 sowie die zur Mutagenese von PFN2a ausgewählten Tyrosin-Reste 29 und 133 sind markiert.

Anhand der Darstellung der Poly-Prolin-Bindungsdomänen in Oberflächenmodellen von PFN1 und PFN2a wird deutlich, dass die hydrophobe Region von PFN2a durch den Tyrosin-Rest 29 wesentlich erweitert wird. Strukturvorhersagen von PFN2a im Komplex mit Poly-Prolin-Peptiden zeigten, dass sich diese Aminosäure optimal in Poly-Prolin-Helices einpasst und somit für die erhöhte Affinität von PFN2a zu Poly-Prolin-Liganden mitverantwortlich sein könnte (Nodelman et al., 1999). Da die Tyrosin-Reste 29 und 133 zumindest nicht offensichtlich in die G-Aktin- und PIP₂-Bindung von PFN2a involviert sind, wurden zur Eliminierung der Poly-Prolin-Bindung diese Aminosäuren durch Serin-Reste substituiert. Unter Verwendung von spezifischen Oligodesoxynukleotiden (siehe Material und Methoden 2.1.6, Tab. 2.3) wurden diese Mutanten durch ortsspezifische Mutagenese hergestellt. Die generierten Profilin-Mutanten sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.2: Liste der generierten Profilin-Mutanten

G-Aktin-Bindungsmutanten	Poly-Prolin-Bindungsmutante
PFN2a F59A	PFN2a Y29,133S
PFN2a R74E	
PFN2a R88E	

Profilin-Mutanten, in denen die G-Aktin-Bindungsdomäne mutiert wurde, wurden analog zu Wildtyp-PFN2a über den prokaryotischen Expressionsvektor pET21c(+) im *Escherichia coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS codon plus exprimiert und anschließend gereinigt.

3.3.5 Präparation von Profilin 2a durch Poly-Prolin-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung von PFN2a sowie dessen G-Aktin-Mutanten aus *E.coli* wurde die Affinitätschromatographie an Poly-Prolin-Sepharose nach Tanaka & Shibata (1985) genutzt. Aufgrund der hohen Affinität von Profilin zu Poly-Prolin konnten stringente Waschbedingungen angewendet werden, so dass rekombinantes Profilin mit hoher Reinheit erhalten wurde. In Abb. 3.26 sind die einzelnen Reinigungsschritte einer PFN2a-Präparation exemplarisch dokumentiert.

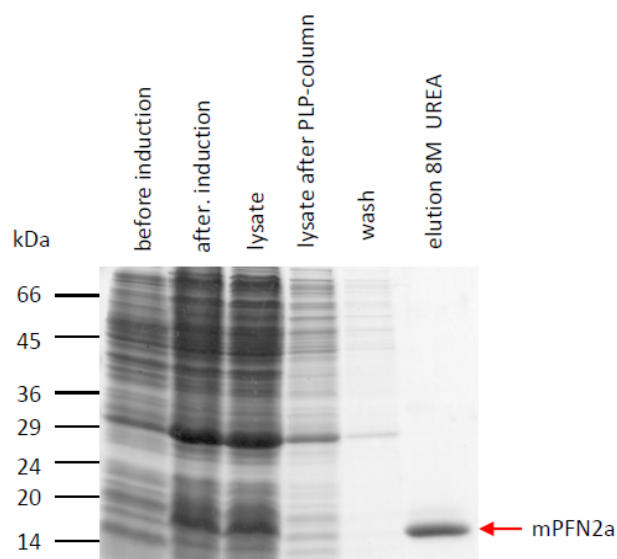


Abb. 3.26: SDS-PAGE-Analyse einzelner Fraktionen einer Profilin 2a-Präparation

Proben einer mPFN2a-Reinigung wurden in einem 13,75% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt: Bakterienextrakt vor der Induktion der Profilin-Expression, Lysat induzierter *E. coli* vor Auftrag auf die Affinitätssäule, nicht gebundene Proteine nach Auftrag auf die Säule (Durchbruch), die vereinigten Waschfraktionen sowie die vereinigten Fraktionen nach Elution des PFN2a mit 8 M Harnstoff, Dialyse und Konzentrierung.

Im gefärbten SDS-PAA-Gel verdeutlicht die Spur, in der das klare Lysat vor dem Auftrag auf die Poly-(L-Prolin)-Affinitätssäule aufgetrennt ist, dass in *E.coli* nach Induktion mit IPTG in sehr hohen Mengen an PFN2a exprimiert wurden. Aus einem Liter Bakterien-Kultur konnten ca. 70 – 100 mg rekombinantes mPFN2a mit einer Reinheit von über 95% präpariert werden. Alle potenziellen G-Aktin-Mutanten von PFN2a konnten in *E. coli* exprimiert und durch poly-L-Prolin-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Somit belegen diese Ergebnisse, dass die in die G-Aktin-Bindungsdomäne eingeführten Mutationen keinen signifikanten Einfluss auf die Poly-Prolin-Bindung von PFN2a haben.

3.3.6 Präparation der Poly-Prolin-Bindungsmutante mPFN2a Y29,133S über das Impact-CN-Expressionssystem

Durch die Substitution von Aminosäuren in die Poly-Prolin-Bindungsregion geht die Möglichkeit verloren, rekombinantes PFN2a wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, zu reinigen. Prinzipiell können Profileine auch als Fusionsproteine z.B. über GST- oder His-tags gereinigt werden.

Da aus biochemischen Studien bekannt ist, dass Profilin-Fusionsproteine in ihren biochemischen Eigenschaften beeinträchtigt sein können (Wittenmayer et al., 2000; Lambrechts et al., 2002), wurde für die Reinigung der Poly-Prolin-Mutante mPFN2a Y29,133S das Impact-CN-Expressionssystem gewählt. Bei diesem Expressionssystem werden rekombinante Fusionsproteine generiert, die neben dem Zielprotein eine Chitin-Bindungsdomäne beinhalten. Durch die Bindung an eine Chitin-Matrix ist eine effiziente Separation des Fusionsproteins von den übrigen endogenen *E.coli*-Proteinen möglich. Gegenüber anderen Expressionssystemen besitzt das Impact-CN-System den Vorteil, dass der Chitin-bindende Fusionsanteil des rekombinanten Proteins durch eine über Reduktionsmittel induzierbare Autoproteolyse abgetrennt werden kann. In diesem Fall verbleibt die Chitin-Bindungsdomäne als sogenanntes Intein auf der Chitin-Matrix, während das Zielprotein mit hoher Reinheit eluiert werden kann. Eine solche Reinigung der PFN2a-Mutante mPFN2a Y29,133S ist in Abb. 3.27 dargestellt.

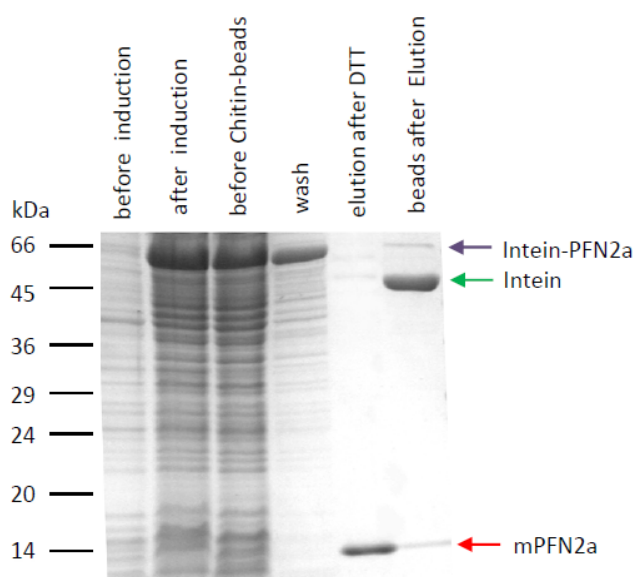


Abb. 3.27: Reinigung der Poly-Prolin-Bindungsmutante mPFN2a Y29,133S über das Impact-CN-System

Darstellung der Reinigung der Poly-Prolin-Bindungsmutante mPFN2a Y29,133S in einem Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gel. Es wurden aufgetragen: Bakterienextrakt vor der Induktion der Profilin-Expression, Lysat induzierter *E. coli*, das klare Lysat vor Auftrag auf die Chitin-Säule, Waschfraktionen, vereinigte Elutionfraktionen nach Zugabe von DTT sowie die Chitin-Matrix nach Elution des abgetrennten Profilins.

Die Poly-Prolin-Bindungsmutante mPFN2a Y29,133S wurde über den Impact-CN-Vektor pTYB12 in dem BL21-*E.coli*-Stamm ER2566 exprimiert und anschließend per Chitin-Affinitätschromatographie gereinigt. Anhand des Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gels ist zu sehen, dass durch Induktion mit IPTG die Expression eines 70 kDa schweren Proteins induziert wurde. Dieses stellt das Intein-Profilin-Fusionsprotein dar. Dieses Fusionsprotein konnte effizient durch Zugabe von 50 mM DTT in das immobilisierte Intein mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa und das gewünschte 15 kDa schwere Profilin gespalten werden. Letzteres wurde von der Chitin-Säule eluiert, so dass unter Einsatz eines Säulenvolumens von 7,5 ml eine Ausbeute von 14 mg hochreinem mPFN2a Y29,133S pro Liter Bakterienkultur erhalten werden konnte.

3.3.7 Biochemische Charakterisierung der Profilin 2a-Bindungsmutanten

Nach erfolgreicher Generierung und Reinigung der Profilin-Mutanten galt es zu überprüfen, ob die in das PFN2a-Molekül eingeführten Mutationen effizient die Bindung an G-Aktin oder Poly-Prolin-Motive unterdrücken konnten. Die unveränderte Affinität der potenziellen G-Aktin-Bindungsmutanten zu Poly-Prolin ließ sich bereits während der Präparation feststellen. Für die Mutante mPFN2a Y29,133S war eine Bestimmung der Affinität zu Poly-Prolin-Motiven nötig, was durch qualitative und quantitative Analysen erfolgte. Die Affinität aller generierten PFN2a-Mutanten zu G-Aktin wurde anhand kinetischer Messungen der Aktin-Polymerisation bestimmt.

3.3.7.1 Analyse der Affinität von mPFN2a Y29,133S zu Poly-Prolin

Aufgrund der Reinigung des mPFN2a Y29,133S über das Impact-CN-System war es nicht sofort ersichtlich, ob diese PFN2a-Mutante noch an Poly-Prolin-Motive bindet. Daher wurde zunächst eine Präzipitation von mPFN2a WT und mPFN2a Y29,133S mit Poly-Prolin-Sepharose durchgeführt, wodurch die Poly-Prolin-Bindung zunächst qualitativ bestimmt wurde. Für die Präzipitation wurden mPFN2a und mPFN2a Y29,133S mit einem Überschuss an Poly-Prolin-Sepharose inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurden die überstehende Lösung und die Poly-Prolin-Sepharose separiert. Letztere wurde vor der SDS-PAGE unter stringenten Bedingungen mehrfach gewaschen, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Der Verbleib der eingesetzten Proteine wurde anschließend durch die Färbung des SDS-PAA-Gels mit Coomassie nachgewiesen (Abb. 3.28).

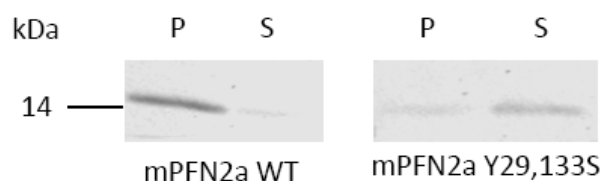


Abb. 3.28: Pull down-Experiment von mPFN2a WT und mPFN2a Y29,133S mit Poly-Prolin-Sepharose

mPFN2a WT und mPFN2a Y29,133S wurden mit Poly-Prolin-Sepharose inkubiert und anschließend per Zentrifugation sedimentiert. Der Anteil an Poly-Prolin-Sepharose gebundener (P) und im Überstand (S) befindlicher Proteine wurde per SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung erfasst.

Die Analyse der Poly-Prolin-Präzipitation zeigt deutlich, dass im Gegensatz zum mPFN2a WT die Mutante mPFN2a Y29,133S größtenteils im Überstand zu finden ist und somit über eine wesentlich geringe Affinität zu Poly-Prolin-Liganden zu verfügen scheint.

Zur Verifikation dieses Ergebnisses wurde die Poly-Prolin-Bindung dieser Profilin-Mutante durch spektralfluorimetrische Messung quantitativ bestimmt. Dieses Experiment beruht auf der Fluoreszenzänderung der Tryptophane, die bei Konformationsänderungen des zu untersuchenden Proteins auftreten kann. Von PFN1 ist bekannt, dass bei Bindung eines selbst nicht fluoreszierenden Poly-Prolin-Peptids die Tryptophanfluoreszenz um den Faktor 2,5 anwächst (Perelroizen et al., 1995). Entsprechend wurden 10 μ M mPFN2a bzw. mPFN2a Y29,133S mit steigenden Konzentrationen an gelöstem Poly-Prolin versetzt. Die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz wurde bei 295 nm angeregt und bei 335 nm gemessen (Abb. 3.29).

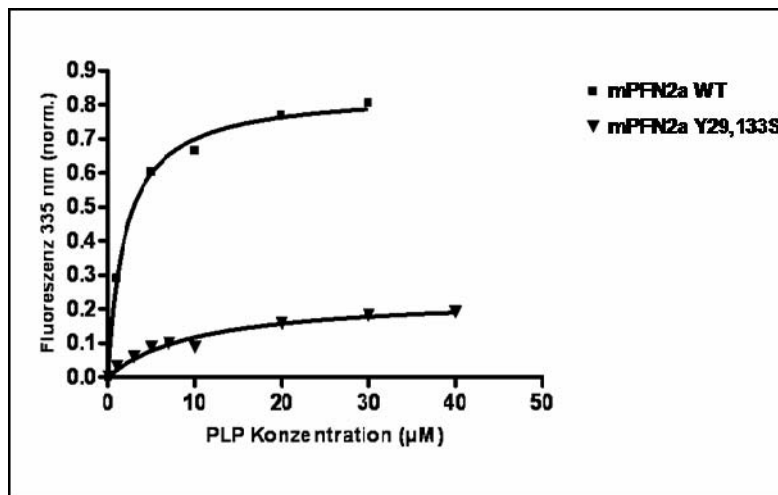


Abb. 3.29: Spektralfluorimetrische Messung der Poly-Prolin-Bindung von mPFN2a und mPFN2a Y29,133S

10 μ mol mPFN2a bzw. mPFN2a Y29, 133S wurden mit zunehmenden Mengen gelöstem Poly-Prolin (PLP) versetzt. Die intrinsische Fluoreszenz der Tryptophane wurde bei 335 nm gemessen.

Hierbei zeigte mPFN2a WT eine drastische Zunahme der Tryptophan-Fluoreszenz, die bereits bei einer Poly-Prolin-Konzentration von 10 μ M ein Plateau erreicht. Die Fluoreszenzwerte der Poly-Prolin-Mutante mPFN2a Y29,133S stiegen hingegen nur äußerst gering an und blieben letztendlich weit unter dem Wert der Messungen von mPFN2a WT. Mittels dieser sowohl qualitativen als auch quantitativen Analysen wird deutlich, dass durch die Substitutionen der Tyrosin-Reste 29 und 133 hohe Affinität von PFN2a zu Poly-Prolin-Motiven drastisch reduziert werden konnte. Neben der Analyse der Poly-Prolin-Bindung galt es zu zeigen, inwiefern diese eingeführten Mutationen die G-Aktin-Bindung beeinflussen.

3.3.7.2 Einfluss der Profilin 2a-Mutanten auf die Aktin-Polymerisation

Für quantitative Bestimmungen der G-Aktin-Bindung von Profilin kann dessen Eigenschaft genutzt werden, die Polymerisation von G-Aktin zu inhibieren. Der Grad der Aktin-Polymerisation lässt sich *in vitro* anhand der Zugabe von Pyren-Aktin verfolgen, dessen Fluoreszenz bei Inkorporation in Aktin-Filamente um den Faktor 25 ansteigt (Kouyama & Mihashi, 1981). Eine effiziente Variante dieser Methode ist die Messung der Aktin-Polymerisation in Echtzeit (non steady state). Hierbei werden G-Aktin und Profilin unter nicht-polymerisierenden Bedingungen für kurze Zeit inkubiert. Anschließend wird die Polymerisation des Aktins durch Zugabe von Magnesium- und Kalium-Ionen induziert. Bei bestehender Affinität des Profilins zu G-Aktin wird dessen Polymerisationskinetik erheblich verzögert, da Profilin die kritische Konzentration für die Bildung von Aktin-Filamenten erhöht.

Auf diese Weise wurde die Aktin-Bindung der generierten PFN2a-Mutanten analysiert. Die in den verschiedenen Ansätzen über die Zeit gemessenen Fluoreszenzintensitäten des Pyren-Aktins wurden vergleichend in einem Diagramm dargestellt (Abb. 3.30).

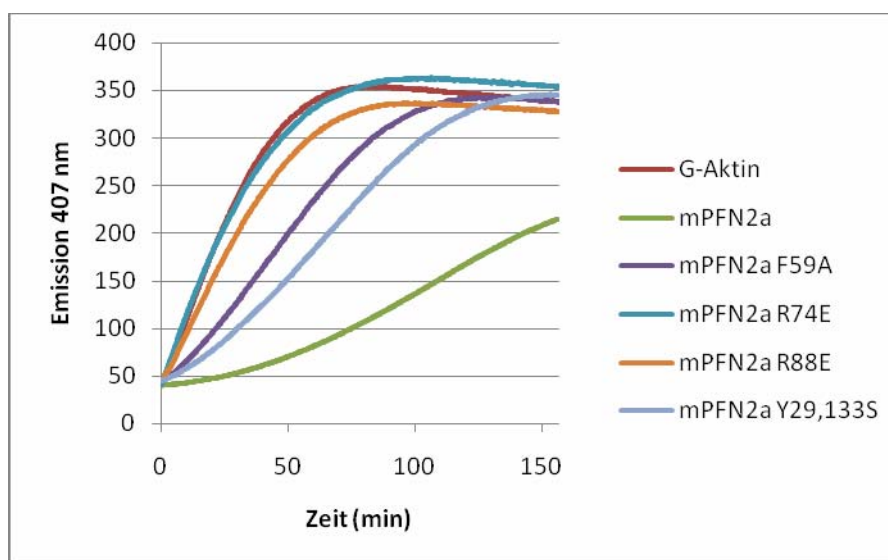


Abb. 3.30: Effekt von Wildtyp-Profilin 2a und Profilin 2a-Mutanten auf die Aktin-Polymerisation

5 μM G-Aktin (5% Pyren-Aktin) wurden ohne bzw. mit 15 μM einer Profilin 2a-Variante inkubiert. Durch Zugabe von 2 mM MgCl_2 und 50 mM KCl wurde die Polymerisation des G-Aktins induziert. Die Aktin-Polymerisation wurde bei 407 nm anhand der Fluoreszenz des Pyren-Aktins über 2 h verfolgt.

Ausgehend vom Kurvenverlauf des G-Aktins ohne Profilin wurden $T_{1/2}$ -Werte für das gebildete F-Aktin aller Ansätze ermittelt (Tab. 3.3). Die Zugabe von Kalium- und Magnesium-Ionen führte im Referenzansatz ohne Profilin zu einer schnellen Polymerisation des Aktins. Innerhalb von 50 Minuten erreichte das gebildete F-Aktin seinen Maximalwert, der die restliche Zeit der Messung konstant blieb.

In Übereinstimmung mit vorherigen Beschreibungen (Lambrechts et al., 1995) bewirkte die Anwesenheit von PFN2a eine drastische Verzögerung der Aktin-Polymerisation, so dass im Vergleich zu dem Referenzansatz zum Zeitpunkt $T_{1/2}$ nur 23,8% F-Aktin gebildet wurden.

Tab. 3.3: Quantifizierung des zum Zeitpunkt $T_{1/2}$ gebildeten F-Aktins

Profilin	F-Aktin (%) zum Zeitpunkt $T_{1/2}$
mPFN2a	23,8
mPFN2a Y29,133S	42,8
mPFN2a F59A	53,2
mPFN2a R88E	83,9
mPFN2a R74E	99,9

Die in Tabelle 3.3 angegebenen Messwerte des gebildeten F-Aktins zum Zeitpunkt $T_{1/2}$ zeigen, dass analog zu PFN1 die Substitution des Arginin-Restes 74 zu einem völligen Verlust der Aktin-Bindung von PFN2a führte (Korenbaum et al., 1998). Die Mutation des Arginin-Restes 88 bewirkte hingegen zwar eine drastische Reduktion, aber keinen vollständigen Verlust der Aktin-Bindung von PFN2a. Entgegen der deutlichen Reduzierung der G-Aktin-Bindung von PFN1 durch die Mutation des Tyrosin-Restes 59, führte die Mutation des Phenylalanin-Restes 59 nur zu einer moderaten Beeinträchtigung der Aktin-Bindung von PFN2a (Schlüter et al., 1998). Obwohl die Tyrosin-Reste 29 und 133 nicht direkt an der Interaktion von PFN2a mit Aktin beteiligt sind, hatte auch deren Substitution eine Schwächung in der G-Aktin-Bindung von PFN2a zur Folge. Diese Beeinträchtigung der Poly-Prolin-Mutante in der Aktin-Bindung ist allerdings geringer als bei den generierten G-Aktin-Mutanten.

Die biochemische Charakterisierung hat somit gezeigt, dass erfolgreich Mutanten generiert wurden, die weitestgehend nur eine Bindungseigenschaft von PFN2a ausgeschaltet haben. Für weiterführende RNAi-Experimente wurde die PFN2a-Aktin-Bindungsmutante mPFN2a R74E sowie die Poly-Prolin-Bindungsmutante mPFN2a Y29,133S verwendet.

3.3.8 Einsatz des Profilin 2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Systems in organotypischen Neuronen

Um die mögliche Rolle von PFN2a in neuronalen Prozessen zu untersuchen, wurde das entwickelte „Knock down & Knock in“-Vektorsystem in Zusammenarbeit mit Kristin Michaelsen (TU Braunschweig) in organotypischen Hippocampus-Kulturen zum Einsatz gebracht. Zu Beginn wurden Hippocampi postnatal (P5) aus Bl/6-Mäusen isoliert, transversal geschnitten und kultiviert.

Anschließend wurden die Hippocampus-Schnitte mittels Partikelkanone am DIV7 mit dem PFN2a-spezifischen RNAi-Vektor pRNAT 2.13 und den „Knock down & Knock in“-Vektoren, die für YFP-mPFN2a WT, YFP-mPFN2a R74E oder YFP-mPFN2a Y29,133S codieren, transfiziert. Zur Visualisierung der dendritischen Morphologie wurde in diesen Ansätzen die GFP-Variante GFP-F, die in der Plasmamembran verankert ist, co-transfiziert. Als Kontrollzellen dienten CA1-Neurone, die nur mit GFP-F markiert wurden. Entsprechend der in Kapitel 3.3.2 ermittelten Dauer bis zum RNAi-bedingten Verlust des endogenen PFN2a wurden die transfizierten Schnitte eine Woche nach Transfektion kultiviert und anschließend fixiert. Zunächst lag der Fokus dieser Untersuchungen auf der dendritischen Komplexität von CA1-Pyramidenzellen. Zur Bestimmung der dendritischen Komplexität wurden jeweils die apikalen und basalen Dendriten transfizierter CA1-Neuronen per Sholl-Analyse untersucht (Abb. 3.31, Sholl et al., 1953).

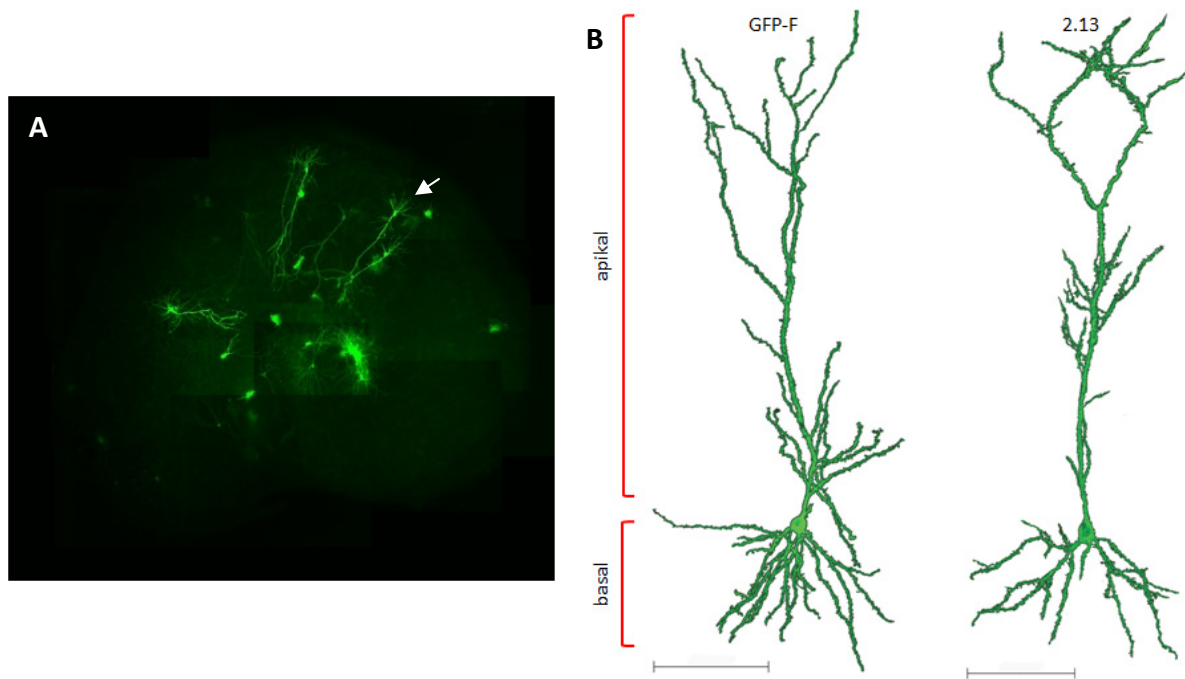


Abb. 3.31: Darstellung organotypisch kultivierter CA1-Neurone nach Transfektion mit dem Profilin 2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Vektorsystem und pEGFP-F

Organotypisch kultivierte Hippocampi wurden mittels Partikelkanone mit PFN2a-spezifischen Knock down bzw. „Knock down & Knock in“-Vektoren und dem pEGFP-F-Plasmid co-transfiziert. In Abbildung A ist exemplarisch eine per Partikelkanone pEGFP-F-transfizierte Hippocampus-Kultur dargestellt. Eine transfizierte CA1-Pyramidenzelle ist durch einen Pfeil markiert. In Abb. B ist repräsentativ ein als Kontrolle fungierendes pEGFP-F positives CA1-Neuron (links) sowie ein mit pRNAT 2.13 transfiziertes CA1-Neuron (rechts) dargestellt. Die apikalen und basalen Dendriten, deren dendritische Komplexität per Sholl-Analyse untersucht wurde, sind durch rote Klammern hervorgehoben. (Balken: 100 μm , übernommen aus Michaelsen, Murk et al., manuscript in preparation).

Die Sholl-Analysen der apikalen Dendriten zeigten, dass der Verlust von PFN2a eine erhebliche Reduktion der dendritischen Komplexität in Bereichen zur Folge hat, in denen die Dendriten der CA1-Neuronen die meisten Verzweigungen besitzen (Abb. 3.31, 3.32). Eine gleichzeitige Substitution des endogenen PFN2a durch YFP-PFN2a über einen „Knock down & Knock in“-Vektor behob weitestgehend die verringerte Komplexität der apikalen Dendriten.

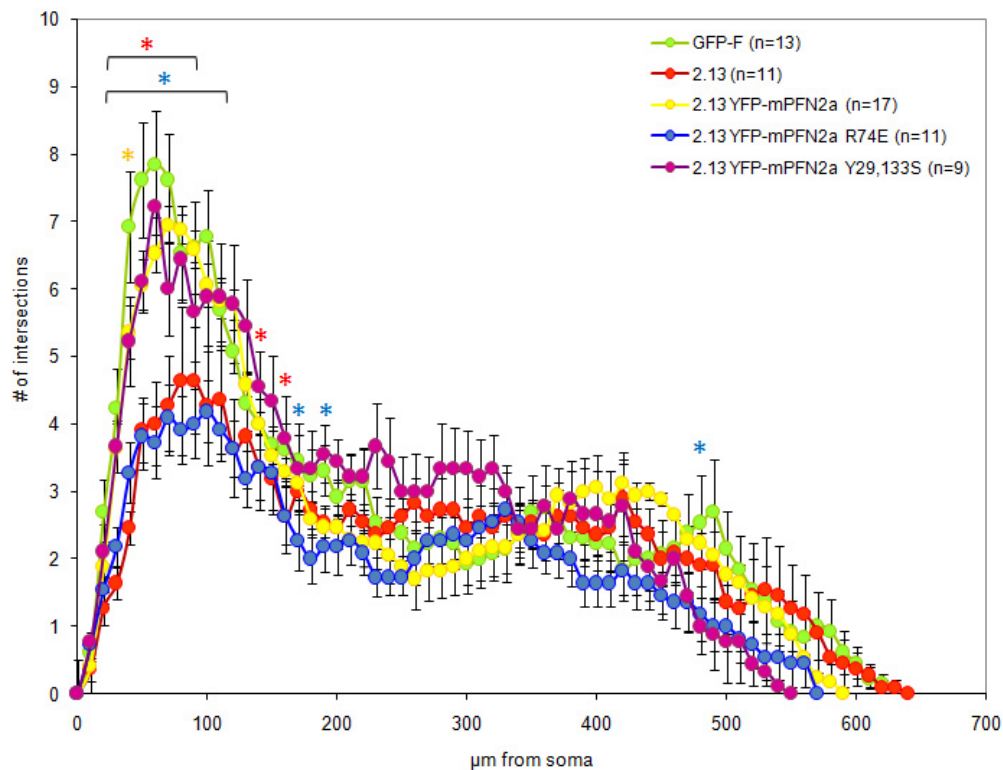


Abb. 3.32: Sholl-Analysen apikaler Dendriten nach Transfektion mit Profilin 2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Vektoren

Bestimmung der dendritischen Komplexität apikaler Dendriten von CA1-Neuronen nach Verlust von PFN2a (2.13) bzw. Substitution des endogenen PFN2a gegen YFP-mPFN2a (2.13-YFP-mPFN2a), YFP-mPFN2a R74E (2.13-YFP-mPFN2a R74E) und YFP-mPFN2a Y29,133S (2.13-YFP-mPFN2a Y29,133S). GFP-F positive CA1-Neurone dienten als Kontrollzellen. Statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test relativ zu GFP-F-positiven Kontrollzellen (p-Wert < 0,05, übernommen aus Michaelsen, Murk et al., manuscript in preparation)

Ein Rückgang an dendritischen Verzweigungen nach Verlust von PFN2a legt die Hypothese nahe, dass PFN2a die Morphologie neuronaler Zellen über die Organisation des Aktin-Cytoskeletts reguliert. In diesem Fall sollte die Fähigkeit des PFN2a, G-Aktin zu binden, von entscheidender Bedeutung sein. Folglich wurden in analogen Experimenten das endogene PFN2a gegen die in Kapitel 3.3.7 charakterisierte Aktin-Bindungsmutante mPFN2a R74E durch das „Knock down & Knock in“-Vektorsystem substituiert.

Diese Profilin-Mutante, die über praktisch keine G-Aktin-Bindung verfügt, konnte den negativen Effekt des PFN2a-Verlustes auf die dendritische Komplexität nicht kompensieren (Abb. 3.32). Die dendritische Komplexität bei Expression der PFN2a-Mutante mPFN2a R74E ist eher noch stärker reduziert als in Neuronen ohne endogenes PFN2a und ohne Substitution. Hingegen induzierte die Substitution des endogenen PFN2a gegen die Poly-Prolin-Bindungsmutante mPFN2a Y29,133S keine Veränderungen in der dendritischen Komplexität. Entsprechend zu den Sholl-Analysen der apikalen Dendriten wurde die Komplexität der basalen Dendriten in CA1-Neuronen bestimmt (Abb. 3.33).

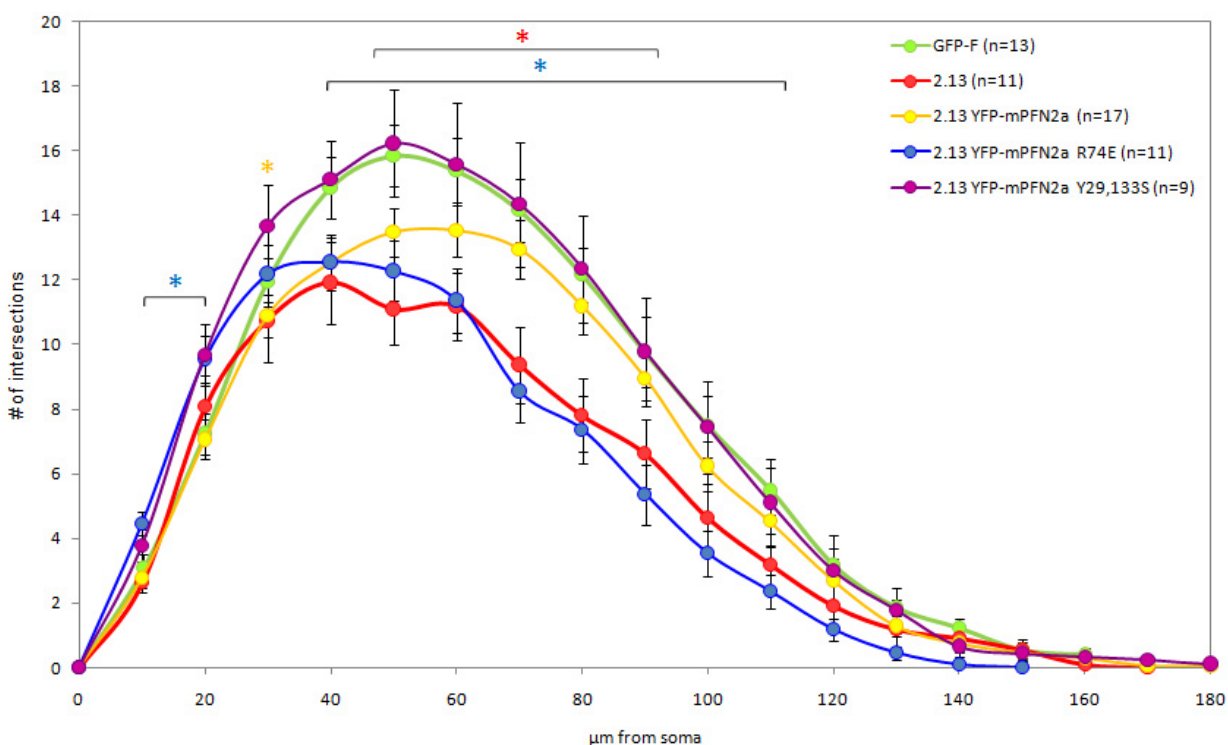


Abb. 3.33: Sholl-Analysen basaler Dendriten nach Transfektion mit Profilin 2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Vektoren

Bestimmung der dendritischen Komplexität basaler Dendriten von CA1-Neuronen nach Verlust von PFN2a (2.13) bzw. Substitution des endogenen PFN2a gegen YFP-mPFN2a (2.13-YFP-mPFN2a), YFP-mPFN2a R74E (2.13-YFP-mPFN2a R74E) und YFP-mPFN2a Y29,133S (2.13-YFP-mPFN2a Y29,133S). GFP-F-positive WT-CA1-Neurone dienten als Kontrollzellen. Für die statistische Auswertung wurde der t-Test relativ zu GFP-F Kontrollzellen verwendet (p-Wert < 0,05, übernommen aus Michaelsen, Murk et al., manuscript in preparation).

Prinzipiell konnten die in den apikalen Dendriten gemessenen Effekte nach Verlust bzw. Substitution des PFN2a auch in den basalen Dendriten beobachtet werden. Der Verlust von PFN2a reduziert vor allem ab einem Radius von 50 µm erheblich die Anzahl der dendritischen Verzweigungen, während die Expression des exogenen YFP-PFN2a WT diesen Effekt tendenziell ausgleicht (Abb. 3.31, 3.32).

Die Substitution des endogenen PFN2a durch die PFN2a-Mutante mPFN2a R74E führt in den basalen Dendriten zu einem stärkeren Rückgang der dendritischen Komplexität als der alleinige Verlust von PFN2a. Anhand dieser Daten wird erstmals belegt, dass der spontane Verlust von PFN2a im entwickelten Nervensystem eine Beeinträchtigung in der Morphologie von Neuronen nach sich zieht. Der erfolgreiche Erhalt der dendritischen Komplexität in CA1-Neuronen nach Substitution des endogenen PFN2a durch YFP-PFN2a unterstreicht die Funktionalität des entwickelten „Knock down & Knock in“-Systems.

Durch die Expression einer PFN2a-Aktin-Mutante bei gleichzeitigem Verlust des endogenen PFN2a wurde demonstriert, dass für die normale dendritische Komplexität die Interaktion von PFN2a mit G-Aktin essentiell ist.

Neben den dendritischen Verzweigungen wurden in Kooperation mit Kristin Michaelsen (TU Braunschweig) mit „Knock down & Knock in“-Vektorsystem der Einfluss von PFN2a auf die „dendritic spines“ von organotypisch kultivierten CA1-Neuronen untersucht. Anhand dreidimensionaler Intensitätsprojektionen fixierter CA1-Neurone wurde die Dichte der „dendritic-spines der apikalen, mid-apikalen und basalen Dendriten bestimmt (Abb. 3.34).

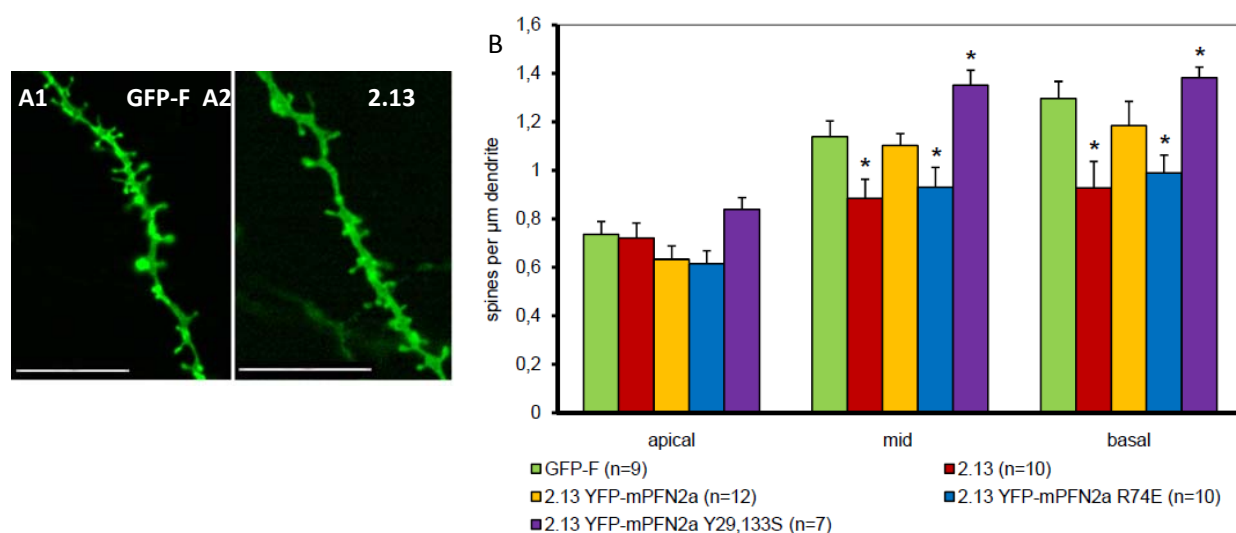


Abb. 3.34: Quantifizierung der „dendritic spine“-Dichte in organotypischen CA1-Neuronen nach Transfektion mit Profilin 2a-spezifischen „Knock down & Knock in“-Vektoren

Darstellung basaler Dendriten einer GFP-F positiven Kontrollzelle (A1) und eines mit dem PFN2a-spezifischen RNAi-Vektor transfizierten CA1-Neurons (A2, Balken: 10 μ m). Quantifizierung der „dendritic spine“-Dichte in basalen, mid-apikalen (mid) und apikalen Dendriten in CA1-Neuronen nach Knock down bzw. Substitution von PFN2a gegen YFP-mPFN2a (2.13 YFP-mPFN2a), YFP-mPFN2a R74E (2.13 YFP-mPFN2a R74E) und YFP-mPFN2a Y29,133S (2.13 YFP-mPFN2a Y29,133S) durch das „Knock down & Knock in“-System (B, Signifikanz-Analyse per t-Test relativ zu GFP-F-positiven WT-Neuronen, p-Wert < 0,05, übernommen aus Michaelsen, Murk et al., manuscript in preparation).

Analog zu der Bestimmung der dendritischen Komplexität konnten durch das „Knock down & Knock in“-Vektorsystem in unabhängigen Ansätzen reproduzierbare Messwerte bezüglich der Dichten der „dendritic spines“ erzielt werden. Die Analysen ergaben, dass die Dichte der „dendritic spines“ in den mid-apikalen und basalen Dendriten von PFN2a-defizienten Neuronen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erniedrigt ist. Dieser Rückgang in der Dichte der „dendritic spines“ blieb aus, wenn anstelle des endogenen PFN2a RNAi-resistentes YFP-PFN2a in den CA1-Neuronen exprimiert worden war. Hingegen führte die Expression der PFN2a-Aktin-Bindungsmutante mPFN2a R74E in dem Maße zu einer reduzierten Dichte der „dendritic spines“, wie sie zuvor in PFN2a-defizienten CA1-Neuronen beobachtet wurde. Die Substitution des endogenen PFN2a gegen die Poly-Prolin-Bindungsmutante mPFN2a Y29,133S führte im Gegensatz zu den übrigen Ansätzen zu einer signifikanten Erhöhung der dendritic spine-Dichte in den mid-apikalen bzw. basalen Dendriten. In den apikalen Dendriten ist allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschieden behandelten Neuronen zu erkennen.

Die morphologischen Analysen der CA1-Neuronen zeigen, dass das in dieser Arbeit entwickelte „Knock down & Knock in“-System funktionell ist. Mit diesem System war es erstmals möglich, Profilin-Varianten praktisch separat in neuronalen Zellen zu untersuchen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass PFN2a Aktin-abhängig die dendritische Morphologie moduliert.

3.3.9 Isolierung endogener Profilin-2a-Liganden per Intein-Affinitätschromatographie

Um weitere Rückschlüsse auf die möglichen Funktionen von PFN2a im ZNS ziehen zu können, wurde eine Affinitätschromatographie endogener Profilin-Liganden durchgeführt. Anstelle von irreversibel immobilisiertem Profilin wurde in dieser Arbeit das in Kapitel 3.3.6 beschriebene Intein-PFN2a verwendet. Im Gegensatz zu anderen Affinitätschromatographie-Methoden wurden bei diesem Verfahren nicht die Matrix-gebundenen Liganden, sondern die nach Spaltung des Intein-Fusionsproteins freigesetzten Profilin-Ligandenkomplexe analysiert. Dadurch wird die Gefahr einer Kontamination mit Proteinen, die falsch-positiv an die Matrix binden, erheblich reduziert.

Aus Mäusen gewonnenes Hirn-Lysat wurde zur Absorption unspezifisch bindender Proteine zuvor mit einer Chitin-Matrix inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Lysates zu Intein-PFN2a, das an eine Chitin-Matrix gebunden vorlag. Nach intensivem Waschen wurde die Autoproteolyse des Intein-Profilins ausgelöst und anschließend die Profilin-Liganden-Komplexe eluiert. Die Präsenz von Profilin-Liganden im Lysat und Eluat wurde im Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper gezeigt (Abb. 3.35). Zum Nachweis einer Beteiligung von PFN2a an der Endocytose und Exocytose wurden Antikörper gegen Dynamin 1 und Synapsine, Proteine des Vesikeltransports (s. Einleitung), verwendet.

Weiterhin wurden neben Aktin die Profilin-Liganden Mena und Gephyrin, die in Postsynapsen lokalisieren (s. Einleitung), nachgewiesen (Bausen et al., 2006; Rostaing et al., 2006). Die Immunblots gegen Vinculin und Tubulin, die beide nicht an Profilin binden und daher als Negativkontrollen dienten, waren erwartungsgemäß negativ (Abb. 3.36).

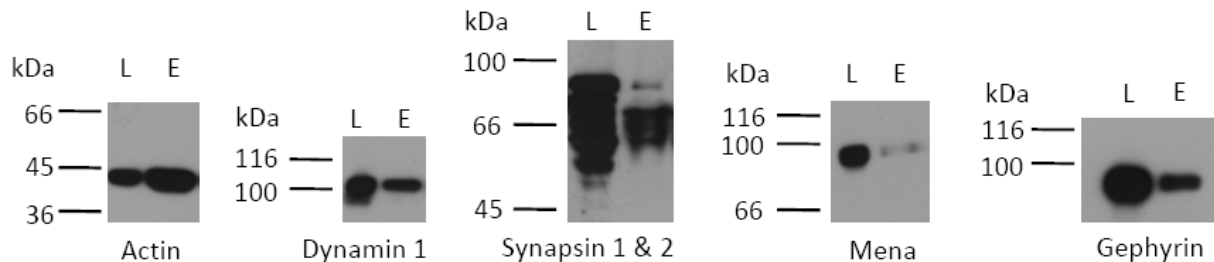


Abb. 3.35: Immunchemischer Nachweis von Profilin 2a-Liganden nach Affinitätschromatographie mit Intein-Profilin 2a

Profilin-Liganden wurden mittels Intein-Profilin 2a aus Maushirn-Lysaten extrahiert und nach Spaltung des Profilin-Fusionsproteins im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dargestellt sind die Lysate (L) vor Auftrag auf die Intein-Profilin 2a-Chitin-Matrix und die Eluate (E) nach Spaltung der Intein-Profilin-Fusionproteine. Nachgewiesen wurden Aktin, Dynamin 1, Synapsin 1 und 2, Mena und Gephyrin mit spezifischen Antikörpern (s. Material und Methoden).

Mittels dieser Methode konnten die beschriebenen Interaktionen von PFN2a mit Dynamin 1 und den Synapsinen 1 und 2 verifiziert werden (Witke et al., 1998; Gareus et al., 2006). Die Western-Blot-Analyse zeigt außerdem erstmals, dass PFN2a nicht alle Varianten der Synapsine 1 und 2 zu binden vermag. Neben Aktin konnten außerdem die Profilin-Liganden Mena und Gephyrin im Eluat identifiziert werden. Somit konnten per Affinitätschromatographie nicht nur, wie zuvor gezeigt, Effektoren von Endocytose und Exocytose, sondern auch Profilin-Liganden aus den Postsynapsen isoliert werden.

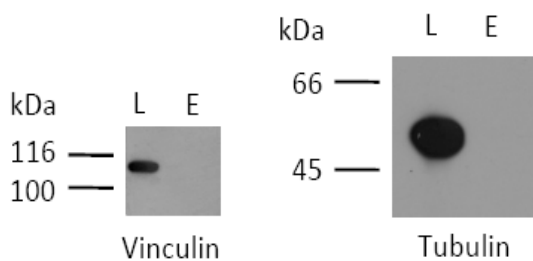


Abb. 3.36: Immunchemische Analyse von Vinculin und Tubulin nach Affinitätschromatographie mit Intein-Profilin 2a

Die Kontrollproteine Vinculin und Tubulin waren in den isolierten Proteinkomplexen erwartungsgemäß nicht nachweisbar. Die verwendeten Antikörper sind in Material und Methoden aufgeführt.

3.4 Analyse von Profilin 1 und 2a in nicht-neuronalen Zellen

Die in dieser Arbeit mit dem „Knock down & Knock in“-Vektorsystem erzielten Resultate deuten auf eine Rolle von PFN2a in der Aktin-abhängigen Organisation von Dendriten und „dendritic spines“ hin. Diese Resultate führten wiederum zu der Frage, ob PFN2a nicht als Aktin-Regulator Funktionen von PFN1 übernehmen kann. Völlig unerwartet konnten durch Untersuchungen von PFN2a im Huhn Erkenntnisse gewonnen werden, die auf eine solche Funktionsübernahme durch endogenes PFN2a schließen lassen.

3.4.1 Konservierung der Profilin-Isoformen 1 und 2a in Vertebraten

Vergleichende Sequenzanalysen von Profilinen aus verschiedenen Phyla zeigen eine nur begrenzte Homologie (Pollard & Quirk, 1994, Polet et al., 2007). Homologie-Analysen, bei denen zunächst nur die murinen Profilin-Isoformen 1 und 2a mit entsprechenden Homologen aus anderen Vertebraten verglichen wurden, ergaben, dass PFN1 innerhalb der Mammalia hochkonserviert ist (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Konservierung der Profilin-Isoformen 1 und 2a innerhalb der Chordata

	<i>Homo</i>	<i>Rattus</i>	<i>Bos</i>	<i>Gallus</i>	<i>Xenopus</i>	<i>Danio</i>
PFN1	95	99	96	76	54	60
PFN2a	98	96	99	99	80	82

% Homologie relativ zu mPFN1 bzw. mPFN2a

In anderen Vertebraten ist PFN1 aber weit weniger konserviert. Hingegen sind die PFN2a-Homologe nicht nur innerhalb der Mammalia, sondern auch in den anderen Klassen der Vertebraten hochkonserviert. Es ist insbesondere überraschend, dass PFN2a in den relativ weit entfernten Spezies Maus und Huhn nahezu identisch vorliegt, während PFN1 in diesen Organismen mit 76% eine geringere Sequenzidentität aufweist (Tab.3.4, grau unterlegt). Aufgrund dieser bemerkenswerten Sequenzidentität der PFN2a-Isoformen von Maus und Huhn wurden die Aminosäure-Sequenzen von PFN1 und PFN2 aus Maus und Huhn detailliert dargestellt (Abb. 3.40).

A

```

1                               62
MSGWAPYVDSLMDAGTCQDAAIVGKYKDTPAVWAATPGKTFANITPAEVNALVSPERGALLVN
MAGWNAYIDSLMDAGTCQDAAIVGKYKDSPSVWAATPGKTFVSIPTAEVGVLVGKDRSSFFVN

63                               124
GLTLGGQKCSVIRDSLIVDGEHTMDLRTKSSAGAPTYNITATITNKTIVLVMGKEGVHGGCV
GLTLGGQKCSVIRDSLIVDGEFTMDLRTKSTGGAPT FNVTVTMTAKTLVLLMGKEGVHGGGLI

125           140
NKKCYEMANHLRRSQY      chPFN1
NKKCYEMASHLRRSQY      mPFN1

```

B

```

1                               62
MAGWQSYVDNLMCDGCCQEAAIVGYCDAKYVWAATAGGIFQSITPVEIDMIVGKDREGFFTN
MAGWQSYVDNLMCDGCCQEAAIVGYCDAKYVWAATAGGVFQSITPVEIDMIVGKDREGFFTN

63                               124
GLTLGAKKCSVIRDSLIVDGDCTMDIRTKSQGGEPTYNVAVGRAGRVLVFVMGKEGVHGGGL
GLTLGAKKCSVIRDSLIVDGDCTMDIRTKSQGGEPTYNVAVGRAGRVLVFVMGKEGVHGGGL

125           140
NKKAYSMAYLRDSGF      chPFN2a
NKKAYSMAYLRDSGF      mPFN2a

```

Abb. 3.37: Sequenzvergleiche der Profilin-Isoformen 1 und 2a aus Maus und Huhn

Nicht konservierte Aminosäuren sind in rot hervorgehoben. chPFN1 und mPFN1 unterscheiden sich insbesondere in den Zentren und C-Termini (A). Die Aminosäure-Sequenzen von chPFN2a und mPFN2a sind mit Ausnahme eines konservativen Austausches an Position 38 identisch (B).

Die Sequenzunterschiede zwischen Hühner-Profilin 1 (chPFN1) und Maus-Profilin 1 befinden sich vor allem im Zentrum und nahe des C-Terminus der Moleküle (Abb. 3.37 A). Hingegen existiert zwischen Hühner-Profilin 2a (chPFN2a) und Maus-Profilin 2a nur ein konservativer Austausch der Aminosäure 38 (Abb. 3.37 B). Diese Sequenzvergleiche deuten daraufhin, dass PFN2a wohl im Laufe der Evolution innerhalb der Vertebraten in weit höherem Maße als PFN1 konserviert blieb. Aufgrund der bisherigen Analysen von PFN2a in Mäusen war zunächst davon auszugehen, dass PFN2a auch in Vertebraten außerhalb der Säuger spezifische Funktionen im ZNS übernimmt. Die im Folgenden beschriebenen Analysen ergeben jedoch ein anderes Bild.

3.4.2 Identifikation von Profilin 1 und 2a in Hühnerfibroblasten

Während der Charakterisierung Profilin-Isoform-spezifischer Antikörper wurden in Western Blot-Analysen neben rekombinanten Profilinen und Extrakten muriner Organe mit bekanntem Profilin-Gehalt auch Lysate aus kultivierten Hühnerfibroblasten eingesetzt. Mit dem in Kapitel 3.1.1 vorgestellten affinitätsgereinigten Antiserum #361 konnte im Western Blot Isoform-spezifisch PFN2a nicht nur erwartungsgemäß im Maushirn, sondern auch überraschend in Hühnerfibroblasten nachgewiesen werden (Abb. 3.38 B). Mit diesem Ergebnis wurde erstmals PFN2a in nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen.

Mit der Identifikation von PFN2a in Hühner-Fibroblasten stellte sich die Frage, welche Funktion ein für das ZNS von Mammalia spezifisches Protein in Zellen ohne neuronale Strukturen wahrnimmt. Aufgrund der biochemischen Eigenschaften von PFN2a war es naheliegend, zu postulieren, dass PFN2a in Hühnerfibroblasten die Aufgabe des in Mammalia ubiquitär exprimierten PFN1 übernehmen könnte. Daher wurden Analysen zu seiner Expression und Lokalisation im Vergleich zu Profilin 1 durchgeführt.

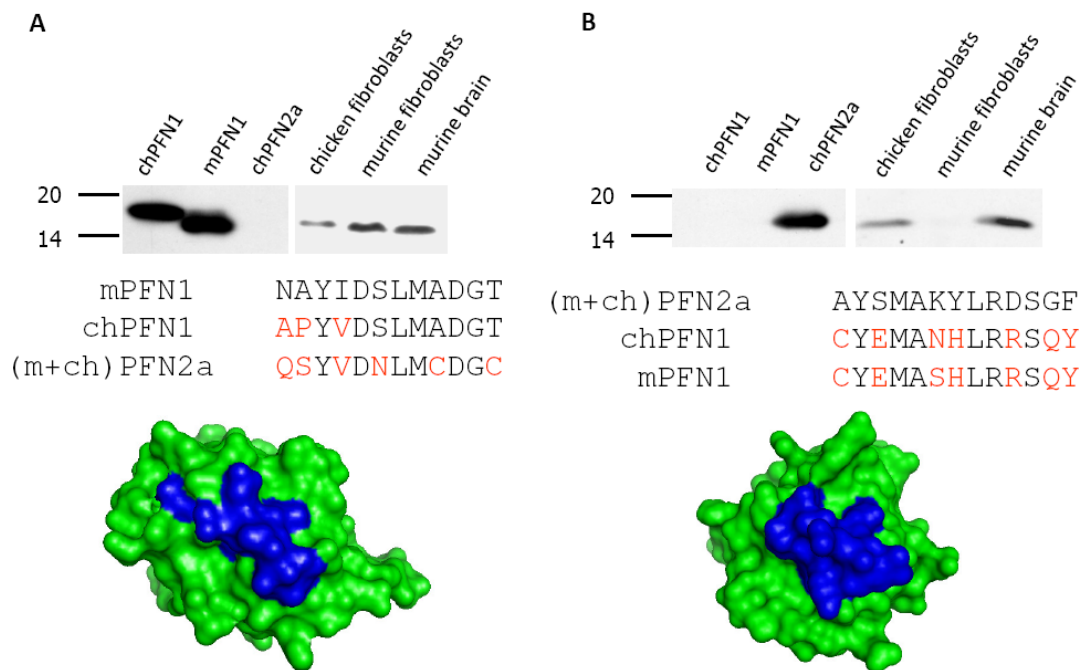


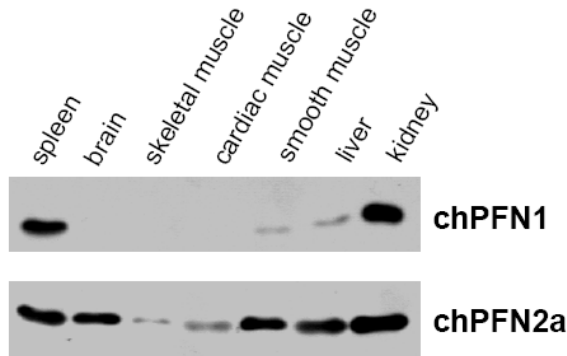
Abb. 3.38: Nachweis von chPFN1 und chPFN2a durch Profilin-Isoform-spezifische Antikörper

In Western Blot-Analysen mit rekombinantem chPFN1, mPFN1, chPFN2a sowie Lysaten aus Hühnerfibroblasten, Maus-Fibroblasten und Maushirn wurde der monoklonale Antikörper 1A11 (A) sowie das affinitätsgereinigte Antiserum #361 (B) verwendet. 1A11 bindet ein N-terminales Epitop, das weitgehend zwischen chPFN1 und mPFN1 konserviert und Oberflächen-exponiert ist. Mittels dieser Antikörper wird die Co-Expression von chPFN1 und chPFN2a in Hühnerfibroblasten nachgewiesen.

Für dieses Vorhaben war der Einsatz von Antikörpern notwendig, die im Western Blot spezifisch chPFN1 nachweisen können. Dies gelang nicht mit dem in Kapitel 3.1.3 detailliert vorgestellten Antikörper 2C5, da dessen Epitop zwischen mPFN1 und chPFN1 divergent ist. Alternativ konnte der monoklonale Antikörper 1A11 eingesetzt werden. Dieser Antikörper bindet ein Epitop, das in chPFN1 und mPFN1, aber nicht in PFN2a, konserviert vorliegt (Abb. 3.38 A). Western Blot-Analysen mit rekombinanten Profilinen, in denen der Antikörper 1A11 chPFN1 und mPFN1 bindet, bestätigen diese Vorhersage. PFN2a wird erwartungsgemäß nicht von diesem Antikörper erkannt. Folglich wurden Extrakte aus Maus- und Hühnerfibroblasten sowie Maushirn mit dem Antikörper 1A11 auf PFN1 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass durch den Antikörper 1A11 die Expression von chPFN1 in Hühnerfibroblasten nachweisbar war. Zur Funktionsanalyse dieser co-exprimierten Profilin-Isoformen waren somit weitere Experimente notwendig. Zunächst wurde damit begonnen, die Expressionsmuster der Profilin-Isoformen in anderen Geweben des Huhns zu bestimmen.

3.4.3 Bestimmung der Expressionsmuster von Profilin 1 und 2a in pränatalen und adulten Geweben des Huhns

Die Expression von chPFN2a in Hühnerfibroblasten könnte ein Hinweis darauf sein, dass PFN2a im Huhn Funktionen von PFN1 ausüben kann. In diesem Fall sollten sich die Expressionsmuster von PFN1 und PFN2a in Huhn und Maus gravierend unterscheiden: PFN2a sollte nicht nur auf das zentrale Nervensystem und, wie gezeigt, auf embryonale Fibroblasten beschränkt sein, sondern analog zu mPFN1 ubiquitär zu finden sein. Daher wurden aus Hühnerembryonen des Entwicklungstages 15 (E15) und adulten Hühnern Organe präpariert, homogenisiert und mit gleichen Proteinmengen in Western Blot Analysen untersucht. Die für die endogenen Profile erhaltenen ECL-Signale wurden densitrometrisch vermessen und anhand einer Kalibrierungsreihe mit definierten Mengen an rekombiantem chPFN1 bzw. chPFN2a quantifiziert (Abb. 3.39 & 3.40, Tab. 3.5 & 3.6).



Tab. 3.5: Quantifizierung von chPFN1 und chPFN2a in adulten Organen

Adult	chPFN1 [%]	chPFN2a [%]
spleen	0.12	0.31
brain	-	0.32
skeletal muscle	-	< 0.02
cardiac muscle	-	< 0.02
smooth muscle	< 0.02	0.26
liver	< 0.02	0.13
kidney	0.16	0.49

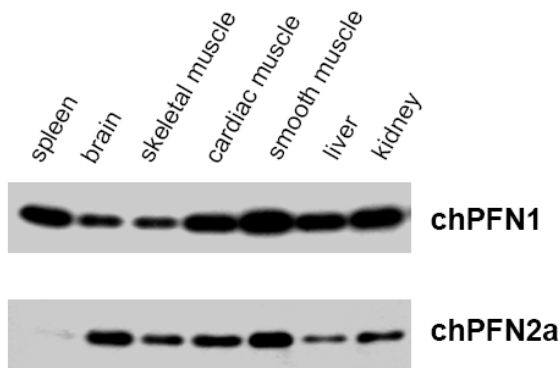
Prozentualer Anteil der Profiline relativ zur Proteingesamtmenge

Abb. 3.39: Expressionsmuster der Profiline 1 und 2a in Organen des adulten Huhns

Organextrakte adulter Hühner wurden in gleichen Proteinmengen durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit den Profilin-Isoform spezifischen Antikörpern 1A11 und #361 analysiert (links). Die Quantifizierung erfolgte per Densitometrie anhand von Kalibrierungsreihen mit rekombinantem Profilin (Tabelle 3.5).

In allen Extrakten adulter Organe konnte chPFN2a in unterschiedlichen Mengen nachgewiesen werden, während chPFN1 in Milz und Niere sowie in geringen Mengen in Glattmuskel und Leber festgestellt werden konnte. In Skelett- und Herzmuskel konnte bei den eingesetzten Extrakt-Mengen kein chPFN1 nachgewiesen werden. Besonders hervorzuheben ist, dass ungleich zur Co-Expression von PFN1 und PFN2a im murinen ZNS der Anteil an chPFN1 im Gehirn des Huhns so gering ist, dass unter diesen Bedingungen nur chPFN2a nachweisbar war. In allen untersuchten adulten Organen, in denen beide Profilin-Isoformen nachgewiesen werden konnten, war mehr chPFN2a als chPFN1 vorhanden.

Im Gegensatz zu dem Expressionsmuster der Profiline in adulten Geweben konnte in allen getesteten Extrakten pränataler Organe chPFN1 und auch chPFN2a identifiziert werden (Abb. 3.40). Abgesehen vom Anteil des chPFN2a im Gehirn überwog in allen anderen Organen chPFN1 (Tab. 3.5). Diese Western Blot-Analysen zeigen somit, dass in den sich entwickelnden Organen des Embryos chPFN1 vorherrschend exprimiert wird. Die Messungen der Profilin-Anteile in pränatalen und adulten Organen legen nahe, dass zu einem unbekannten Zeitpunkt während oder nach der Embryonalentwicklung ein Wechsel von chPFN1 hinzu chPFN2a als vorherrschende Profilin-Isoform stattfindet.



Tab. 3.6: Quantifizierung von chPFN1 und chPFN2a in pränatalen Organen (E15)

E15	chPFN1 [%]	chPFN2a [%]
spleen	0.26	< 0.02
brain	0.12	0.26
skeletal muscle	0.11	0.1
cardiac muscle	0.27	0.09
smooth muscle	0.38	0.31
liver	0.24	0.03
kidney	0.31	0.049

Prozentualer Anteil der Profiline relativ zur Proteingesamtmenge

Abb. 3.40: Expressionsmuster der Profiline 1 und 2a in pränatalen Organen des Huhns

Analog zu Abb. 3.42 wurden Extrakte aus pränatalen Organen (E15) des Huhns durch SDS-PAGE aufgetrennt, im Western Blot analysiert (links) und quantifiziert (Tabelle 3.6). Zu diesem Zeitpunkt werden beide Profiline ubiquitär exprimiert. Allerdings wird mit Ausnahme des Gehirns in den Geweben die Mehrheit des Gesamtprofilins von chPFN1 gebildet.

Die unterschiedlichen Expressionsmuster legen nahe, dass PFN2a allgemein im Huhn die Aktin-Dynamik reguliert, während chPFN1 vor allem in der Entwicklung spezialisierte Funktionen wahrnimmt. Zur Untersuchung einer möglichen funktionellen Diversität von chPFN1 und chPFN2a wurden primäre Hühnerfibroblasten als Zellsystem für weitere Analysen eingesetzt.

3.4.4 Lokalisation und Expression der Profilin-Isoformen 1 und 2a in Hühnerfibroblasten

Um erste Hinweise zu erhalten, ob die Profilin-Isoformen in Hühnerfibroblasten unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen, wurden Hühnerfibroblasten nach der Isolation aus Embryonen für 24 h auf Deckgläsern kultiviert, anschließend fixiert und die Profiline 1 und 2a sowie F-Aktin gefärbt (Abb. 3.41). Entgegen bisheriger Beschreibungen von PFN1 in diversen Zelltypen anderer Organismen ist chPFN1 in frisch isolierten Fibroblasten überwiegend im Zellkern konzentriert (Abb. 3.41 Pfeilspitze). Im Gegensatz dazu befindet sich chPFN2a nicht nur im Zellkern, sondern lokalisiert außerdem im Cytoplasma. Besonders in migrierenden Zellen dekoriert es dort Aktin-Filamente (Abb. 3.41 Pfeile).

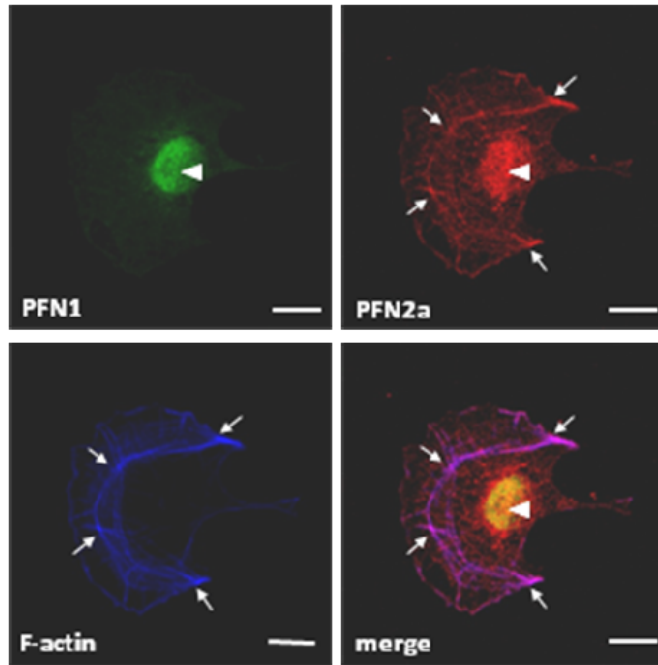
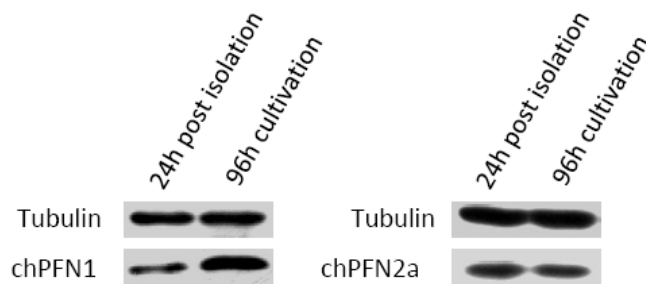


Abb. 3.41: Differenzielle Lokalisation von Profilin 1 und 2a in Hühnerfibroblasten

24 h kultivierte Fibroblasten (E12) wurden fixiert und anschließend chPFN1 (grün) und chPFN2 (rot) gefärbt. F-Aktin (blau) wurde unter Verwendung von Phalloidin-Alexa647 dargestellt. chPFN1 lokalisiert überwiegend im Zellkern (Pfeilspitze), während chPFN2a im Zellkern und Cytosol vorhanden ist. PFN2a dekoriert in migrierenden Fibroblasten Aktin-Filamente (Pfeile).

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass chPFN2a im Gegensatz zu chPFN1 an der Aktin-abhängigen Motilität der Fibroblasten beteiligt sein könnte. Allerdings zeigte sich, dass chPFN1 in Hühnerfibroblasten kultivierungsbedingt seine Expression und Lokalisation ändert (Abb. 3.42 & Abb. 3.43).



Tab. 3.7: Expression von Profilin in Hühnerfibroblasten

	24h post isolation	96h cultivation
chPFN1 [%]	0.15	0.36
chPFN2a [%]	0.23	0.19

Prozentualer Anteil der Profileine relativ zur Proteingesamtmenge

Abb. 3.42: Analyse der kultivierungssabhängigen Expression von Profilin 1 und 2a in Hühnerfibroblasten

Hühnerfibroblasten, die nach Isolierung aus dem Embryo für 24 h oder 96 h in DMEM + 10% FCS kultiviert wurden, wurden geerntet, lysiert und im Western Blot mit den Antikörpern 1A11 und #361 analysiert. Anhand einer Kalibrierungsreihe mit rekombinantem chPFN1 bzw. chPFN2a wurde der prozentuale Anteil der Profilin-Isoformen am Gesamtproteingehalt ermittelt (rechts).

Western Blot-Analysen des Profilin-Gehaltes in primären Hühnerfibroblasten, die für 24 h und 96h in serumreichem Medium kultiviert wurden, zeigten, dass sich die Expressionsrate von chPFN1 oder chPFN2a während der Kultivierung drastisch verändert:

Innerhalb des Zeitraums von 96 h in Kultur hatte sich der chPFN1-Spiegel in den Fibroblasten mehr als verdoppelt, während der Anteil an chPFN2a leicht absank (Abb. 3.42, Tab 3.7).

Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass chPFN1 nach einer Kultivierung von 96 h homogen im Cytoplasma verteilt war, während es in den Zellkernen nur in geringen Mengen nachweisbar war (Abb. 3.43, obere Bildreihe). Für chPFN2a konnte keine kultivierungsabhängige Lokalisationsänderung festgestellt werden (nicht dargestellt).

Für die Ermittlung der Bedingungen, die während der Kultivierung diese veränderte Lokalisation von chPFN1 auslösen, wurde den Fibroblasten über 48 h das fötale Kälberserum entzogen. In drei unabhängigen fluoreszenzmikroskopischen Studien wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten überprüft, inwiefern der Serumentzug Einfluss auf die Lokalisation des chPFN1 hat (Abb. 3.43 & Abb. 3.44).

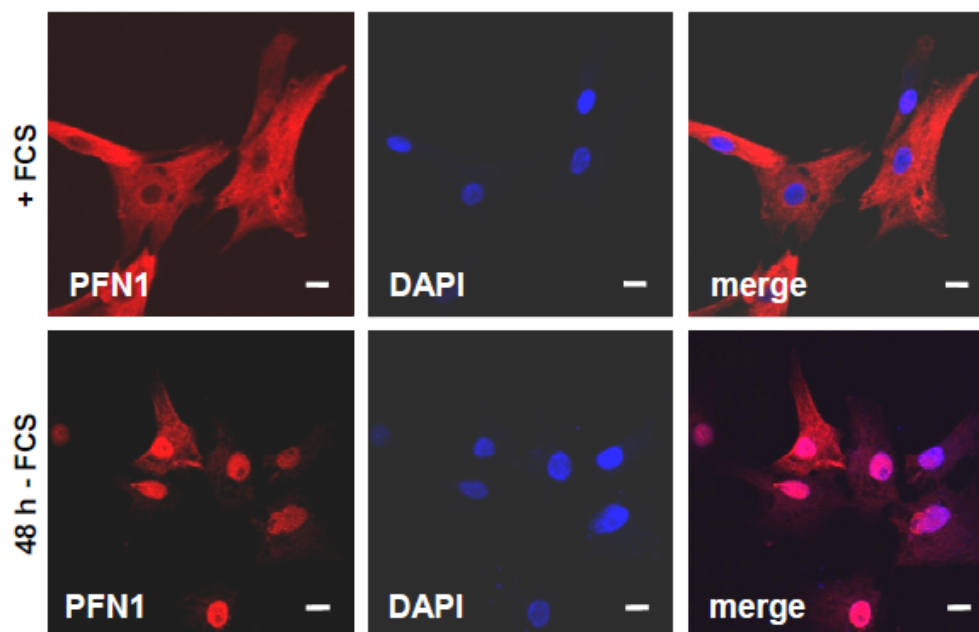


Abb. 3.43: Serum-abhängige Lokalisationsänderung von Profilin 1 in Hühnerfibroblasten

Hühnerfibroblasten wurden nach 96 h Kultivierung in DMEM + 10% FCS für 48 h in serumfreies Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit dem Antikörper 1A11 und DAPI gefärbt und konfokal aufgenommen (Balken: 10 μ m).

Die statistische Auswertung der chPFN1-Lokalisation ergab, dass nach 24 h Serumentzug vermehrt Zellen mit chPFN1 im Zellkern auftraten. Nach 48h Serumentzug wies die Mehrheit der Zellen eine Akkumulation des chPFN1 in den Zellkernen auf, wie sie zu Beginn der Kultivierung in den isolierten Fibroblasten beobachtet werden konnte.

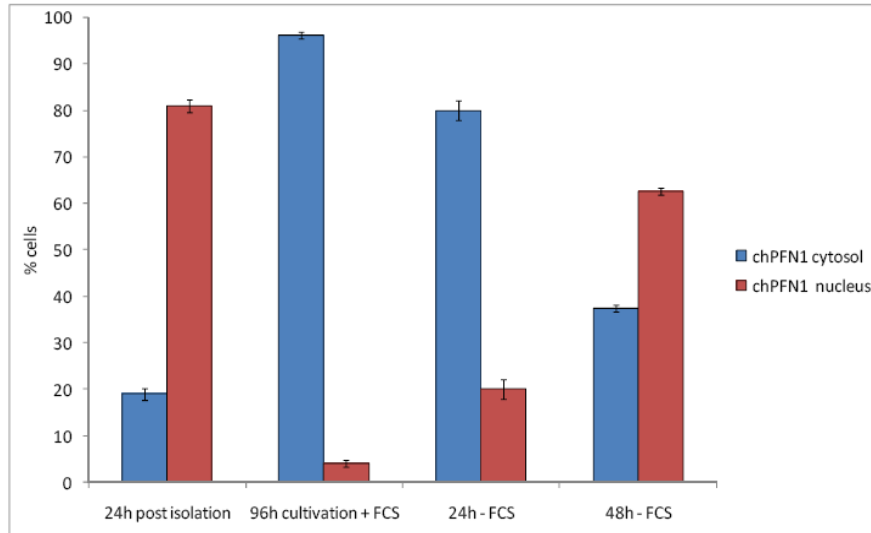


Abb. 3.44: Quantifizierung der Serum-abhängigen Lokalisationsänderung von Profilin 1 in kultivierten Hühnerfibroblasten

Statistische Auswertung der Hühnerfibroblasten mit Akkumulation von chPFN1 im Cytosol (blau) und im Zellkern (rot) 24 h nach Isolation aus dem Embryo, nach 96 h Kultivierung in serumreichem Medium, nach 24 h bzw. 48 h Serumentzug. Die Fehlerbalken basieren auf drei unabhängigen Experimenten (mindestens 220 Zellen pro Experiment).

Die Translokation von chPFN1 in das Cytoplasma ist somit reversibel und abhängig von unbekannten Bestandteilen des fötalen Kälberserums, das bei der Kultivierung verwendet wurde. Mit der variablen Lokalisation von chPFN1 blieb die Hypothese einer funktionellen Diversität von chPFN1 und chPFN2a in Hühnerfibroblasten bestehen.

3.4.5 Isoform-spezifische Phosphorylierung von Profilin 2a in Hühnerfibroblasten

Die Serum-abhängige Lokalisationsänderung von PFN1 wirft die Frage auf, über welchen Mechanismus eine derart deutliche Lokalisationsänderung zustande kommen kann. Eine Möglichkeit sind post-translationale Modifikationen der Profiline wie z.B. über Phosphorylierungen. Da für PFN1 und PFN2a in Mammalia Phosphorylierungen beschrieben worden sind, wurde untersucht, ob in Hühnerfibroblasten chPFN1 und chPFN2a einer solchen Regulation unterliegen (Da Silva et al., 2003; Sathish et al., 2004; Shao et al., 2008). Zur Untersuchung einer möglichen *in vivo*-Phosphorylierung der Profiline wurden Hühnerfibroblasten 24 Stunden nach Isolation aus dem Embryo aus Kulturschalen geerntet, lysiert und in der 2D-Gelelektrophorese analysiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst in einem immobilisierten pH-Gradienten (pH 3-10) durch eine isoelektrische Fokussierung.

Anschließend wurden die Proteine in einer SDS-PAGE gemäß ihrer Molekulargewichte aufgetrennt und im Western Blot mit den Antikörpern 1A11 und #361 analysiert (Abb. 3.45).

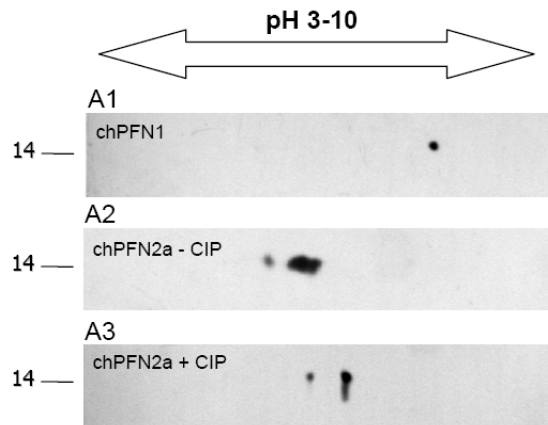


Abb. 3.45: Analyse der *in vivo*-Phosphorylierung von Profilin in Hühnerfibroblasten

Zum Nachweis einer möglichen Phosphorylierung von chPFN1 und chPFN2a wurden Lysate von frisch isolierten Hühnerfibroblasten durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit den Profilin-Isoform-spezifischen Antikörpern 1A11 und #361 analysiert. chPFN1 wurde gemäß des isoelektrischen Punktes (pI 7,79) und Molekulargewichtes nachgewiesen (A1). Die Detektion von chPFN2a im Western Blot ergab mehrere Signale, die in Richtung der Anode verschoben waren (A2). Zum Nachweis einer Phosphorylierung wurden die Lysate mit „calf intestine phosphatase (CIP)“ behandelt (A3). Die CIP-Behandlung resultierte in einer Verschiebung der chPFN2a-Signale in Richtung des isoelektrischen Punktes von chPFN2a (pI 6,86).

Der Nachweis von chPFN1 mit dem Antikörper 1A11 ergab ein distinktes Signal im Western Blot gemäß des isoelektrischen Punktes von chPFN1 (pI 7,79, Abb. 3.45 A1). Im Gegensatz zum PFN1-Nachweis zeigte die Entwicklung mit dem PFN2a-spezifischen Antiserum #361 mehrere Signale für chPFN2a, die zudem in Richtung der Anode verschoben waren (Abb. 3.45 A2). Die Existenz eines stärker negativen geladenen chPFN2a deutet auf eine Phosphorylierung hin. Zum Nachweis einer Phosphorylierung wurde das Fibroblasten-Lysat vor der elektrophoretischen Auftrennung mit der „calf intestine phosphatase (CIP)“ inkubiert. Diese Behandlung veränderte die Auftrennung des chPFN2a zu distinkten Signalen, die in Richtung des isoelektrischen Punktes von chPFN2a (pI 6,86) verschoben waren (Abb. 3.45 A3). Somit konnte in den Hühnerfibroblasten eine Isoform-spezifische Phosphorylierung von chPFN2a nachgewiesen werden. Die Lokalisationsänderung des chPFN1 ist folglich nicht abhängig von einer Phosphorylierung. In weiteren Analysen sollten in kultivierten Hühnerfibroblasten beide Profilin-Isoformen selektiv mittels RNAi ausgeschaltet werden.

3.4.6 RNA-Interferenz der Profilin-Isoformen 1 und 2a in Hühnerfibroblasten

Zur Analyse der funktionellen Diversität von PFN1 und PFN2a in Hühnerfibroblasten wurden zunächst für jede Profilin-Isoform sechs verschiedene shRNAs auf der Basis des pRNAT U6.3-Vektors eingesetzt. Im Gegensatz zu humanen und murinen Zellen konnte mit diesem shRNA-Vektorsystem in keinem der Ansätze ein Knock down von Profilin beobachtet werden. Vermutlich ist das Fehlen der RNA-Interferenz anhand einer Inkompatibilität des shRNA-produzierenden U6-Promotors zu erklären. Aufgrund von Nukleotidaustauschen im „proximal sequence element“ der U6-Promotoren von Huhn und Mensch erfolgt die Transkription der shRNAs in Hühnerzellen entweder nicht oder nur ineffektiv (Simmen et al., 1992; Domitrovich & Kunkel, 2003). Anstelle von shRNA-Plasmiden mit U6-Promotoren wurde ein Vektorsystem in Hühnerfibroblasten verwendet, das auf der Produktion von micro-RNAs (miRNAs) basiert. Analog zu shRNAs codieren diese miRNAs für siRNA-Sequenzen, die bei der Prozessierung durch die Enzyme Drosha und Dicer entstehen (Meister & Tuschl, 2004). In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass miRNAs Zielgene effizienter als shRNAs ausschalten können (Boden et al., 2004; Silva et al., 2005; Dickins et al., 2005). Der verwendete miRNA-Vektor pcDNA6.2-EmGFP-miR enthält die codierende Sequenz der humanen miRNA miR155 unter Kontrolle des CMV-Promotors (Abb. 3.46). Dieser ist im Gegensatz zu dem humanen U6-Promotor speziesübergreifend auch im Huhn funktionell.

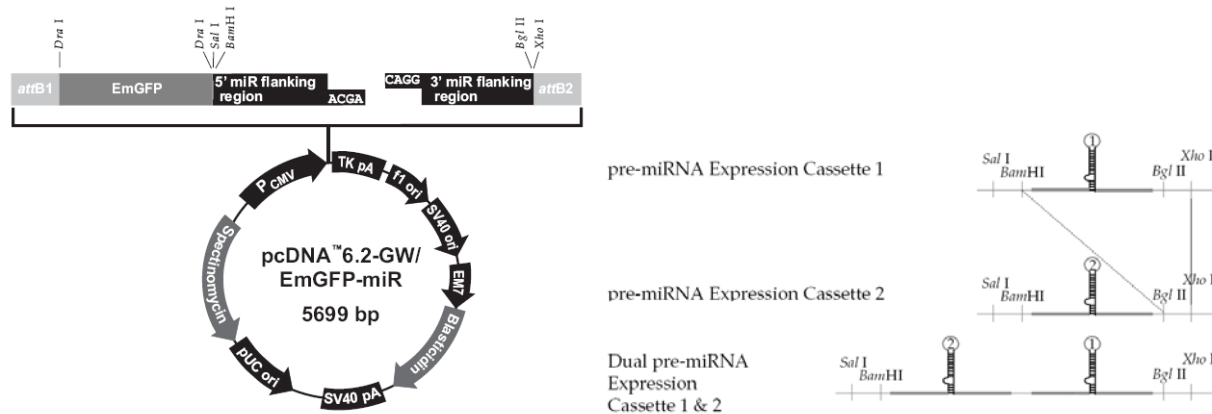


Abb. 3.46: Darstellung des miRNA-Vektors pcDNA6.2-EmGFP-miR

Schematische Darstellung des RNAi-Vektors pcDNA6.2-EmGFP miR (oben). Der Vektor codiert für eine polycistronische mRNA, die die cDNAs der GFP-Variante EmGFP und der miR155 beinhaltet. Die Position zur Insertion genspezifischer Oligonukleotide in die miR155-Sequenz ist in Form einer Lücke dargestellt (links). Darstellung der Klonierung bicistronischer miRNA-Plasmide auf der Basis des pcDNA6.2-EmGFP-miR (rechts). Die Abbildungen wurden aus dem BlockITTM miR RNAi-Expression Vector-Manual (Invitrogen) übernommen.

Eine zusätzliche Eigenschaft dieses RNAi-Vektorsystems ist der polycistronische Aufbau des miRNA-Transkripts. Über den CMV-Promotor wird eine mRNA generiert, die einerseits die codierende Region für das GFP-Reportergen enthält. Außerdem befindet sich in dieser mRNA auch die miRNA miR155, in die Profilin spezifische siRNA-Sequenzen eingebracht wurden. Zwar erlaubt dieses RNAi-System aufgrund seines Aufbaus keine simultane Substitution des Zielgens wie die in dieser Arbeit entwickelten „Knock down & Knock in“-Plasmide, aber in Form eines Kassetten-Systems können mehrere miRNA-Sequenzen in den Vektor inseriert werden. Somit werden mittels eines miRNA-Vektors verschiedene Zielgene gleichzeitig ausgeschaltet.

Zum Knock down von chPFN1 bzw. chPFN2a wurden miRNA-Sequenzen *in silico* ermittelt. Diese spezifischen miRNA-Sequenzen für chPFN1 (miRNA 1/1-1/6) und chPFN2 (miRNA 2/1-2/6) wurden in Form synthetischer Oligonukleotide in den miRNA-Vektor pcDNA6.2-EmGFP-miR kloniert. Analog zu den mPFN1- und mPFN2a-spezifischen shRNA-Vektoren wurden diese miRNA-Vektoren in Co-Transfektionsexperimenten auf ihre Effizienz getestet (nicht dargestellt). Von diesen zwölf miRNA-Konstrukten konnten die PFN1-spezifischen Vektoren miRNA 1/3 und miRNA 1/5 sowie die PFN2a-spezifischen Plasmide miRNA 2/3 und 2/6 effektiv die ektopische Expression von chPFN1 bzw. chPFN2a verhindern. Auf der Basis der funktionellen miRNA-Konstrukte 1/5 und 2/3 wurde ein bicistronischer Vektor, miRNA 1/5 & 2/3, generiert, mit dem beide Hühnerprofiline gleichzeitig ausgeschaltet werden sollten. Die erfolgreiche Unterdrückung der Genexpression von endogenem chPFN1 bzw. chPFN2a wurde anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen belegt. Kultivierte Hühnerfibroblasten wurden jeweils mit den miRNA-Konstrukten 1/3, 1/5, 2/3, 2/6 sowie 1/5 & 2/3 transfiziert, zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und mit Profilin-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Konstrukte miRNA 1/3 und miRNA 1/5 inhibieren weitestgehend die Expression von chPFN1, wobei keine negativen Effekte auf die chPFN2a-Expression erkennbar waren (Abb. 3.47, obere Bildreihe mit miRNA 1/5-transfizierten Zellen). Analog erfolgte mit den Konstrukten miRNA 2/3 und miRNA 2/6 der Knock down von chPFN2a, ohne die Expression von chPFN1 offensichtlich zu beeinflussen (Abb. 3.47, mittlere Bildreihe mit miRNA 2/3-transfizierten Fibroblasten). Analog zu den miRNA-Vektoren, über die die Profilin-Isoformen einzeln in ihrer Genexpression inhibiert wurden, konnte mithilfe des bicistronischen miRNA-Vektors 1/5 & 2/3 die Expression von chPFN1 und chPFN2a effektiv verhindert werden (Abb. 3.47, untere Bildreihe).

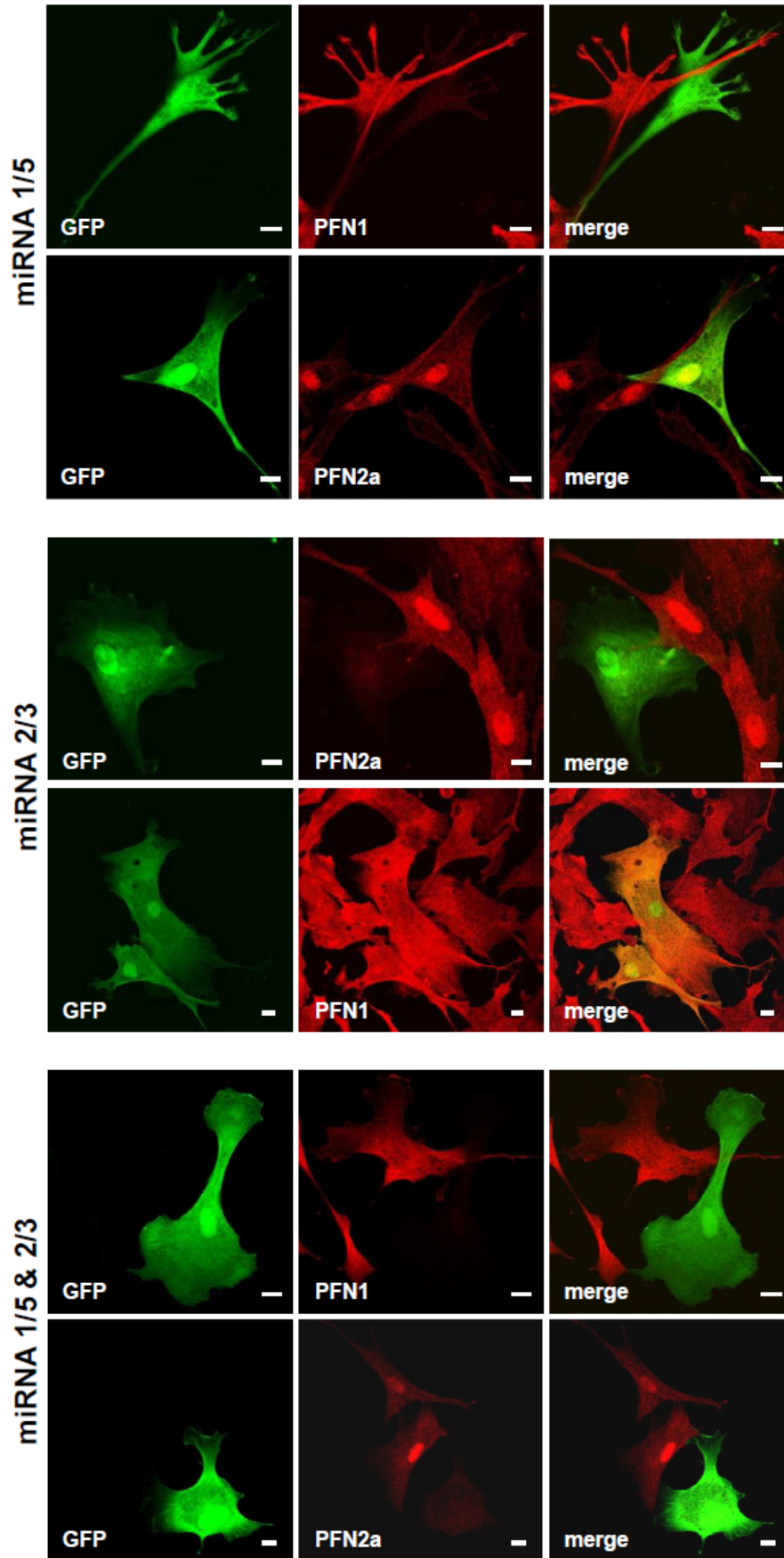


Abb. 3.47: Profilin-Isoform-spezifischer Knock down von Profilin 1 und Profilin 2a in Hühnerfibroblasten

Hühnerfibroblasten wurden mit den miRNA-Vektoren miRNA 1/5 (obere Bildreihe), miRNA 2/3 (mittlere Bildreihe) und miRNA 1/5 & 2/3 (untere Bildreihe) transfiziert. Acht Tage nach der Transfektion wurden die Fibroblasten fixiert, chPFN1 bzw. chPFN2a gefärbt und konfokal mikroskopiert (Balken: 10 μm). Die eingesetzten miRNA-Vektoren inhibieren Isoform-spezifisch die Expression der Profiline. Durch den bicistronischen Vektor miRNA 1/5 & 2/3 können beide Profiline simultan in ihrer Expression gehemmt werden.

Auffällig war bei diesen RNAi-Experimenten, dass die Hühner-Profiline die nahezu gleiche Halbwertszeit besaßen wie die zuvor untersuchten Mammalia-Profiline. Endogenes chPFN1 ist wie hPFN1 in HeLa-Zellen 96 h nach der Transfektion kaum noch nachzuweisen. Analog zu neuronalem mPFN2a tritt der Knock down von chPFN2a erst acht Tage nach Transfektion ein. Für funktionelle Analysen wurden demnach Fibroblasten acht Tage nach deren Transfektion mit den miRNA-Vektoren verwendet. Als Kontrollzellen dienten Fibroblasten, die in diesem Zeitraum eine β -Galactosidase (lacZ)-spezifische miRNA produzierten. Diese miRNA besitzt keine nennenswerte Homologie zu eukaryontischen Genen und diente somit als „nonsense“-Kontrolle. Mit diesem Vektorsystem ist es möglich, in primären Hühnerfibroblasten spezifisch die Expression von chPFN1 und/oder chPFN2a zu inhibieren. In den folgenden funktionellen Analysen wurde der Einfluss der Profilin-Isoformen auf Aktin-abhängige Prozesse näher untersucht.

3.4.7 Untersuchung der Funktionen von Profilin 1 und Profilin 2a in Aktin-abhängigen Prozessen kultivierter Hühnerfibroblasten

Zur Analyse der Funktionen von chPFN1 und chPFN2a wurden die RNAi-behandelten Fibroblasten in Experimenten untersucht, die eine effizient ablaufende Aktin-Dynamik erfordern. In einem „spreading-assay“ wurde analysiert, inwiefern der Verlust der Profilin-Isoformen die Anheftung und Rekonstitution der Zellmorphologie nach enzymatischer Dissoziation beeinflusst. Weiterhin wurde in einem Chemotaxis-Experiment der Effekt des Profilin-Verlustes auf die gerichtete Bewegung der Fibroblasten getestet.

3.4.8 Analyse des Matrix-Kontaktes Profilin-defizienter Fibroblasten

Für die Untersuchung der Adhäsion und des anschließenden Ausbreitens Profilin-defizienter Fibroblasten wurden die Zellen mittels Trypsin-Behandlung von ihrem Substrat gelöst und auf Collagen-beschichtete Deckgläsern ausgesät. Nach 30 Minuten wurden die Fibroblasten fixiert, das Aktin-Cytoskelett gefärbt und in fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Anteil angehefteter und ausgebreiteter Zellen bestimmt. Transfizierte Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten hinsichtlich ihrer Morphologie und des Zustandes des Aktin-Cytoskeletts in zwei Kategorien unterteilt (Abb. 3.48, links): Flache, weit ausgebreitete Zellen mit deutlich erkennbaren Aktin-Filamenten (Gruppe 1) und kompakte Zellen, die höchstens rudimentär über Aktinbündel verfügen (Gruppe 2, Abb. 3.48 links). Die statistische Auswertung zur Gruppe 1 gehöriger Fibroblasten ergab, dass sich chPFN1 defiziente Fibroblasten in der Geschwindigkeit der Anheftung und Ausbreitung nicht signifikant von den Kontrollzellen unterscheiden. Hingegen weisen Fibroblasten, deren chPFN2a-Gehalt durch RNAi drastisch reduziert wurde, unter diesen Bedingungen eine statistisch signifikante Verzögerung dieser Prozesse auf.

Bei Fibroblasten, in denen beide Profilin-Isoformen ausgeschaltet wurden sank im Vergleich zu den Kontrollzellen der Anteil ausgebreiteter Zellen um ca. 50% (Abb. 3.48, rechts).

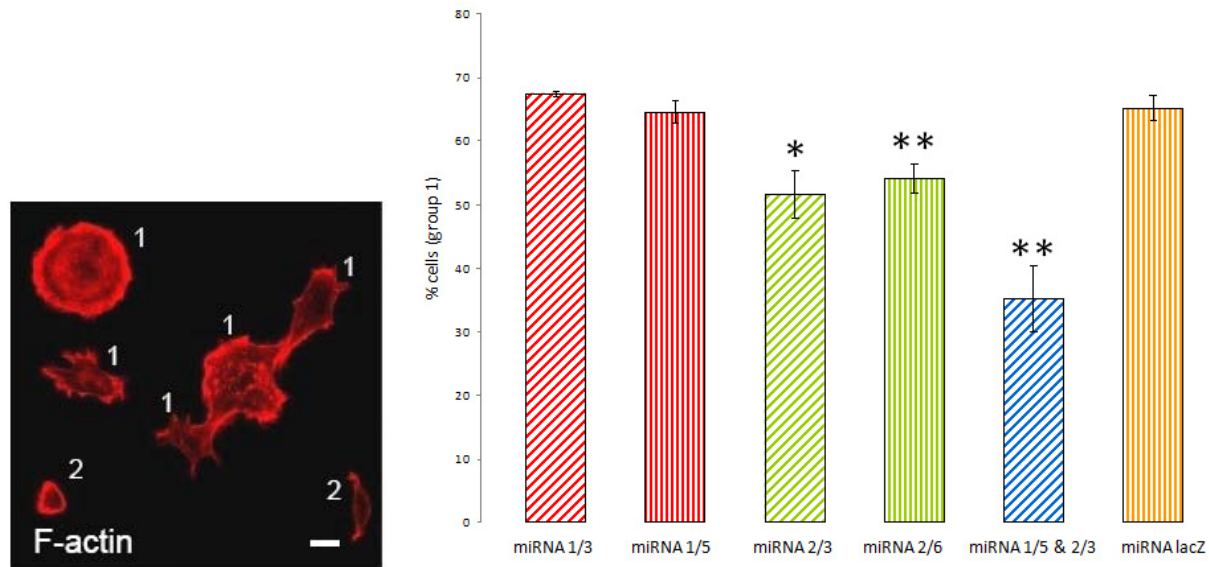


Abb. 3.48: Anheftungsverhalten von Hühnerfibroblasten nach Knock down von PFN1 und/oder PFN2a

Mit RNAi-Vektoren transfizierte, primäre Hühnerfibroblasten wurden auf Collagen-beschichteten Deckgläsern ausgesät und nach 30 Minuten fixiert. Anschließend wurde das Mikrofilamentsystem mit Phalloidin-Alexa546 gefärbt (links). Für die Auswertung wurden die Fibroblasten anhand ihrer Morphologie in zwei Kategorien unterteilt: Flache, ausgebreitete Zellen (Gruppe 1), die sich von kompakten, nicht ausgebreiteten Zellen (Gruppe 2) deutlich unterscheiden. Exemplarisch sind entsprechend kategorisierte Fibroblasten dargestellt (links). Der Anteil ausgebreiteter Zellen (Gruppe 1) wurde in drei unabhängigen Experimenten ermittelt und statistisch ausgewertet (rechts, mindestens 423 Zellen pro Experiment, statistische Auswertung per t-Test, $p < 0,05$).

Somit scheinen beide Profilin-Isoformen unter den gewählten Bedingungen in Hühnerfibroblasten an der Adhäsion und der Regulation der Zellmorphologie beteiligt zu sein, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Obwohl die chPFN1-Menge in den kultivierten Fibroblasten doppelt so hoch ist wie der natürliche chPFN2a-Gehalt, kann chPFN1 offenbar nur unvollständig den Verlust von chPFN2a kompensieren. Hingegen ist die Präsenz von chPFN2a allein für ein normales Anheftungsverhalten der Fibroblasten ausreichend. Die in diesem Experiment beobachteten Defekte im Anheften und Ausbreiten der Zellen lassen auf strukturelle Veränderungen in den Adhärenzverbindungen schließen.

3.4.9 Analyse der Anheftungsstrukturen Profilin-defizienter Hühnerfibroblasten

Fibroblasten bilden in Zellkultur sogenannte Fokalkontakte aus, mit denen die Zellen Kontakt zur extrazellulären Matrix halten. Fokalkontakte bestehen aus hochkomplexen Proteinaggregaten, in denen Vinculin ein prominentes Strukturprotein darstellt. Zur Untersuchung von Veränderungen in den Zell-Matrix-Kontakten wurde in Profilin-defizienten Hühnerfibroblasten daher Vinculin als Marker für Fokalkontakte nachgewiesen (Abb. 3.49, oben). Anschließend wurden in fluoreszenzmikroskopischen Analysen die Flächen von insgesamt 1000 Vinculin-positiven Fokalkontakten aus mindestens 47 Zellen bestimmt (Abb. 3.49 unten).

Die Darstellung aller gemessenen Fokalkontakt-Flächen in einem Histogramm zeigt, dass sich die verschiedenen Flächen der Fokalkontakte in den Kontrollzellen über einen großen Bereich erstreckten. Vergleiche der Fokalkontakte zeigten, dass sich die Flächen der Zell-Matrix-Kontakte von chPFN1-defizienten Zellen (Maximum bei 80-100 pixel²) nur in geringem Umfang von denen der Kontrollzellen (Maximum bei 120 pixel²) unterscheiden (Abb. 3.49, unten). Der Verlust von chPFN2a führte hingegen zu einer erhöhten Anzahl kleinerer Fokalkontakte (Maximum bei 60-80 pixel²), während gleichzeitig die Anzahl großflächiger Anheftungsstrukturen verringert war. In Hühnerfibroblasten, in denen die Expression beider Profiline inhibiert wurde, trat neben dem Verlust großflächiger Fokalkontakte der Trend zu kleineren Fokalkontakten weiter verstärkt auf. Aufgrund dieser Veränderungen in den Zell-Matrix-Kontakten wurde untersucht, ob der Verlust von chPFN1 und/oder chPFN2a auch die Migration der Fibroblasten beeinflusst.

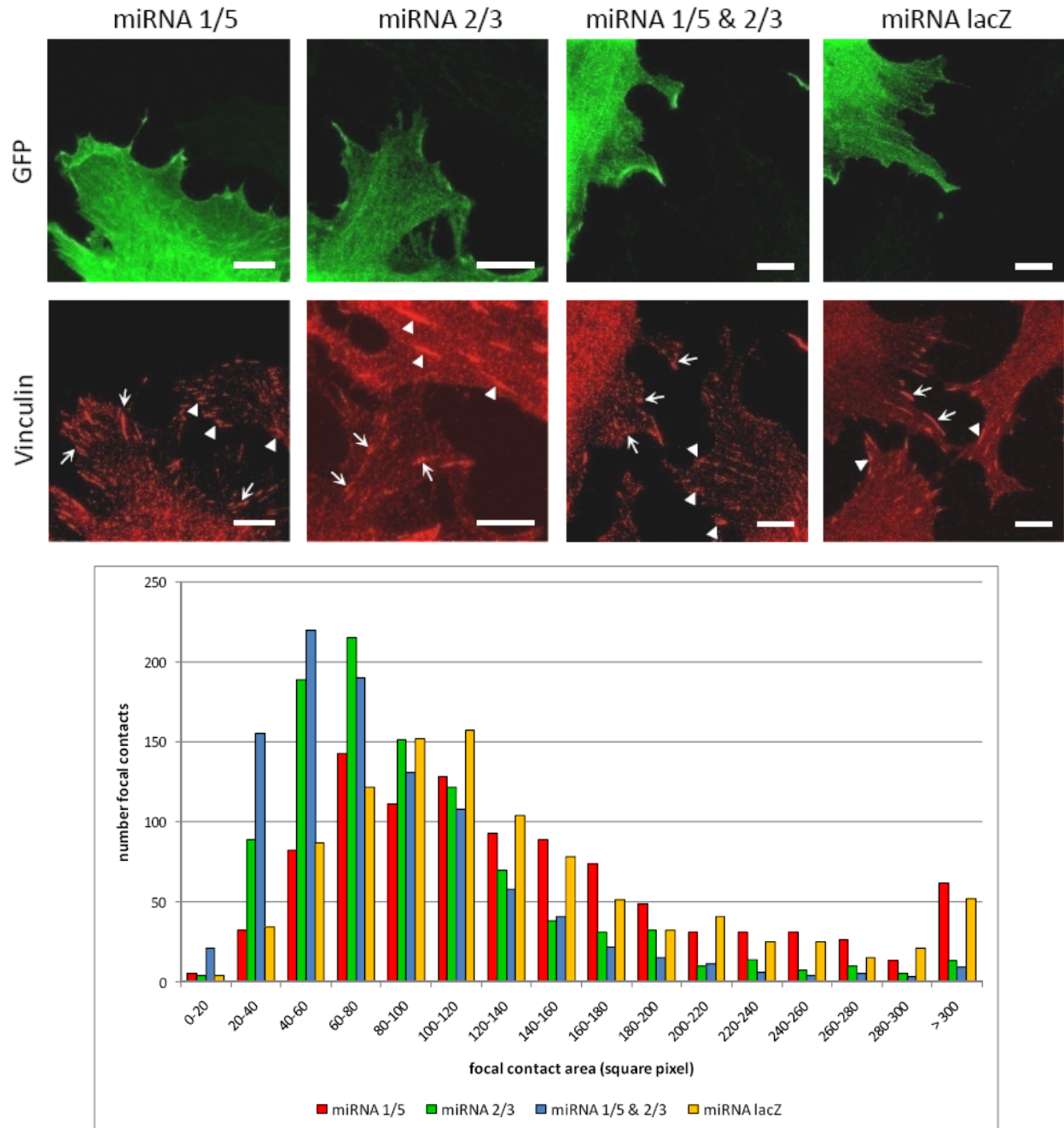


Abb. 3.49: Analyse der Fokalkontakte Profilin-defizienter Hühnerfibroblasten

In miRNA-Vektor-transfizierten Hühnerfibroblasten wurde das in Fokalkontakten enthaltene Vinculin unter Verwendung des hVin1-Antikörpers (rot) gefärbt. Die Peripherie der Fibroblasten wurde mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen (Balken: 10 μm). Exemplarisch sind Fokalkontakte GFP-positiver Zellen mit Pfeilen bzw. in untransfizierten Zellen mit Pfeilspitzen markiert (oben). Die Flächen der Fokalkontakte in Quadratpixeln (pro Ansatz 1000 Fokalkontakte aus mindestens 47 Zellen) sind in einem Histogramm dargestellt (unten).

3.4.10 Analyse der gerichteten Bewegung von Profilin-defizienten Hühnerfibroblasten

Die gerichtete Bewegung der Profilin-defizienten Fibroblasten wurde durch die Generierung eines Nährstoffgradienten stimuliert. Hierfür wurden die transfizierten Zellen über Nacht einem Serumentzug ausgesetzt. Anschließend wurden die Fibroblasten in serumfreiem Medium in Zellkultureinsätze (Greiner bio-one) ausgesät, deren Böden aus einer transparenten Membran mit 8 µm breiten Poren bestehen. Diese Zellkulturansätze wurden in Kulturschalen überführt, so dass sich auf der Unterseite Serum-reiches Medium befand. Aufgrund des entstehenden Serumgradienten bewegten sich die Fibroblasten chemotaktisch zur Unterseite der Membran. Nach 6 h wurden die Zellen sowohl auf der Oberseite als auch der Unterseite der Membran fixiert und mit DAPI gefärbt. Für die statistische Auswertung von GFP-positiven migrierten Fibroblasten wurden in drei unabhängigen Experimenten die Zellzahlen durch konfokale Mikroskopie bestimmt. Die optischen Schnittebenen wurden derart gewählt, dass pro Sichtfeld oberhalb und unterhalb der Membran die Zellen erfasst werden konnten (Abb. 3.50).

Die Mehrheit der chPFN1-defizienten Fibroblasten ist offenbar in der Lage, dem Serumgradienten zu folgen. Dies wird durch die statistische Auswertung aller Versuchsansätze bestätigt, bei der die Unterschiede zwischen den chPFN1-defizienten Fibroblasten und den Kontrollzellen äußerst gering sind (Abb. 3.50). Hingegen wurde die Migration der Fibroblasten durch den Verlust von chPFN2a statistisch signifikant verzögert. Analog zu den vorherigen Experimenten ist die Migration von Fibroblasten, die in denen die Expression von chPFN1 und chPFN2 inhibiert wurde, am deutlichsten eingeschränkt. Entsprechend der vorherigen Resultate aus den Analysen der Zell-Matrix-Kontakte wird anhand dieses Migrationsexperimentes deutlich, dass beide Profiline in die Zellwanderung involviert sind.

Aber auch in der Zellmigration ist PFN2a wohl von größerer Bedeutung, da es für einen ungestörten Ablauf der Zellmigration ausreichend zu sein scheint.

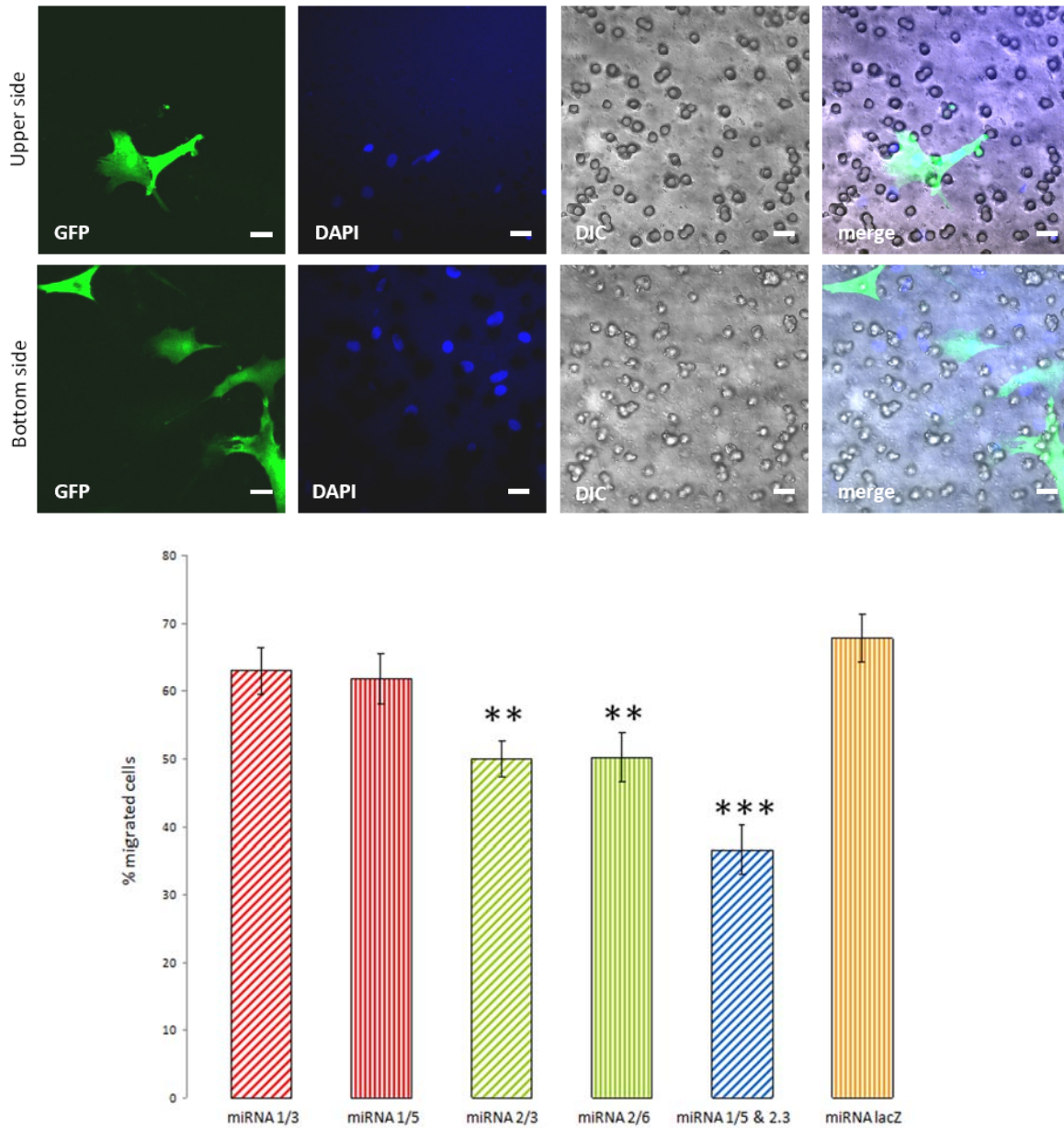


Abb. 3.50: Analyse der chemotaktischen Bewegung von Profilin-defizienten Hühnerfibroblasten

Die chemotaktische Bewegung Profilin-defizienter Fibroblasten wurde über einen Serumgradienten mit Hilfe von Zellkultureinsätzen analysiert. Nach 6 h Migration wurden die Fibroblasten in beiden Kammern der Einsätze fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Wanderung der Fibroblasten ist exemplarisch anhand chPFN1-defizienter Zellen dargestellt (oben). Für die statistische Auswertung des Anteils migrierter Zellen wurden pro Sichtfeld die Fibroblasten oberhalb und unterhalb der Membran mittels konfokaler Mikroskopie erfasst (unten). Die Fehlerbalken resultieren aus drei unabhängigen Experimenten (mindestens 220 Zellen pro Experiment, statistische Auswertung per t-Test, $p < 0,05$).

4 Diskussion

Profiline sind kleine G-Aktin bindende Proteine, die den Nukleotidaustausch der Aktin-Monomeren beschleunigen und diese an die Enden wachsender Aktin-Filamente übertragen, (Jockusch et al., 2007). Da diese Funktionen für die Aktin-Dynamik aller eukaryontischen Zellen essentiell sind, sind die Gründe für die Existenz verschiedener Profilin-Isoformen weitestgehend unbekannt. Im Fall der fünf in Mammalia exprimierten Profilin-Isoformen wurden bisher Profilin 1 (PFN1) und Profilin 2a (PFN2a) näher untersucht. Beide Isoformen werden im zentralen Nervensystem co-exprimiert und besitzen *in vitro* ähnliche biochemische Eigenschaften (Lambrechts et al., 1995, 1997; Witke et al., 2001). Obwohl beide Profilin-Isoformen eine Vielzahl von Liganden gemein haben (Witke, 2004), werden für PFN1 und PFN2a unterschiedliche zelluläre Funktionen in der Neuritogenese, Modulation der Neurotransmitter-Ausschüttung und synaptischen Plastizität postuliert (Ackermann & Matus, 2003, Lambrechts et al., 2006; Pilo-Boyl et al., 2007). Allerdings basiert diese Hypothese zur funktionellen Diversität von PFN1 und PFN2a auf Studien, in denen meistens nur eine Profilin-Isoform detailliert analysiert wurde.

Ein Bestandteil dieser Arbeit war die Analyse der Lokalisation von PFN1 und PFN2a in verschiedenen neuronalen Zellen über Isoform-spezifische Antikörper. Im Gegensatz zu vorherigen immunhistochemischen Analysen (Neuhoff et al., 2005; Pilo-Boyl et al., 2007), wurde hierbei die Lokalisation beider Isoformen gleichzeitig untersucht. Darüber hinaus sollte die Beteiligung von PFN1 und PFN2a an neuronalen Prozessen durch funktionelle Analysen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Vektor-gestütztes RNAi-System entwickelt, mit dem Profilin nicht nur Isoform-spezifisch ausgeschaltet, sondern direkt in Zellen gegen z.B. Profilin-Bindungsmutanten substituiert werden kann. Durch diese Vorgehensweise wurden Limitierungen umgangen, mit denen bisherige Überexpressionsexperimente mit Profilin verbunden waren. Die begrenzte Aussagekraft von bisherigen Überexpressionsexperimenten mit Profilin ist dadurch bedingt, dass exogene Profiline nicht zwangsläufig die Funktion des endogenen Profilins beeinträchtigen. So werden bei Überexpressionsexperimenten meist durch die Erhöhung der Profilin-Menge bedingte Phänomene wie z.B. eine erhöhte Bildung und Stabilität von Aktin-Filamenten in Zellen beobachtet (Finkel et al., 1994; Rothkegel et al., 1996). Für die Untersuchung der Tumor-Suppressor-Funktion von Profilin in Brustkrebszellen war eine solche experimentelle Vorgehensweise geeignet, da diese Tumorzellen einen niedrigeren Profilin-Spiegel als untransformierte Zellen aufweisen, was mit ihren tumorigenen Eigenschaften korreliert. Mithilfe einer artifiziellen Erhöhung der PFN1-Konzentration in diesen Zellen konnte der Einfluss von Profilin auf Aktin-abhängige Prozesse analysiert werden (Janke et al., 2000; Wittenmayer et al., 2004, Zou et al., 2007). Für die Untersuchung von Profilin in Neuronen ist eine solche Vorgehensweise nicht unbedingt geeignet, denn aus Experimenten mit stabil PFN1-transfizierten Neuroblastoma-Zellen ist bekannt, dass die Auswirkungen des exogenen Profilins auf die Neuritogenese in Abhängigkeit des individuellen Expressionsniveaus variieren (Lambrechts et al.,

2006). Im Gegensatz zu diesen Analysen konnte erstmals durch den Knock down von endogenem PFN2a Profilin-Bindungsmutanten direkt in Zellen untersucht werden. Zusätzlich konnten durch verschiedene biochemische und zellbiologische Analysen im Huhn neue Erkenntnisse zur funktionellen Diversität von PFN1 und PFN2a gewonnen werden.

4.1 Profilin 1 und Profilin 2a in Neuronen

Die bisherigen, unabhängig voneinander durchgeführten Studien zur Funktion von PFN1 oder PFN2a in Synapsen ließen keine eindeutige Schlussfolgerung zu, ob eine Profilin-Isoform überwiegend in synaptische Prozesse involviert ist (Jockusch et al., 2007). Dieser Fragestellung konnte durch die gleichzeitige Darstellung von PFN1, PFN2a und Synapsin als synaptischem Marker in kultivierten Neuronen nachgegangen werden. Trotz der Fähigkeit *in vitro* synaptische Proteine zu binden (Mammoto et al., 1998; Wang et al., 1999; Myiagi et al., 2002, Giesemann et al., 2003), wurde PFN1 nur vereinzelt in den Synapsen hippocampaler Neurone nachgewiesen. Dies stimmt prinzipiell mit Resultaten aus immunhistochemischen Studien überein, in denen die Lokalisation von endogenem PFN1 in einzelnen Synapsen des Hippocampus, Neocortex und Cerebellum nachgewiesen werden konnte (Neuhoff et al., 2005). Die gleichzeitige Detektion von PFN2a zeigt allerdings, dass im Vergleich zu PFN1 PFN2a vorwiegend in synaptischen Strukturen lokalisiert. Somit scheint PFN2a die vorherrschende Profilin-Isoform in Synapsen zu sein. Allerdings kann anhand von Immunfluoreszenzstudien einzig mit Synapsin als synaptischem Marker keine gesicherte Aussage über die prä- und postsynaptische Verteilung von PFN2a getroffen werden.

Aufgrund der Assoziation von PFN2a mit Effektoren von Endocytose und Exocytose wurde in einigen Studien postuliert, dass PFN2a überwiegend in präsynaptischen Kompartimenten Funktionen übernimmt (Witke et al., 1998; Gareus et al., 2006; Pilo-Boyl et al., 2007). Analog zu Witke et al. (1998) konnte in Affinitätschromatographie-Experimenten die Bindung von PFN2a an Dynamin 1 sowie Synapsin- nachgewiesen werden. Allerdings wurde im gleichen experimentellen Ansatz auch die Bindung von PFN2a an postsynaptische Proteine wie Gephyrin und Mena bestätigt (Giesemann et al., 2003; Rostaing et al., 2006).

4.1.1 Profilin 2a akkumuliert in inhibitorischen Postsynapsen

Da Profilin das Bindeglied zwischen dem Aktin-Cytoskelett und inhibitorischer Postsynapsen darstellen könnte, wurde in dieser Arbeit die Co-Lokalisation von endogenem PFN1 und PFN2a mit Gephyrin untersucht (Mammoto et al., 1998; Giesemann et al., 2003). Bindungsstudien mit rekombinanten Proteinen kamen zu dem Ergebnis, dass PFN1 und PFN2a über die Aktin-Bindungsdomäne mit Gephyrin wechselwirken (Giesemann et al., 2003).

Prinzipiell konnte in dieser Studie auch die Lokalisation des endogenen Profilins in neuronalen Gephyrin-Clustern gezeigt werden. Allerdings konnte aufgrund des kreuzreagierenden Antiserums nicht näher bestimmt werden, ob PFN1 und/oder PFN2a in den Gephyrin-Clustern vorhanden ist.

Gerade diese Fragestellung konnte in dieser Arbeit mit spezifischen Antikörpern in Co-Lokalisationsexperimenten beantwortet werden. Die Antikörper-Färbungen zeigen die überwiegende Akkumulation von endogenem PFN2a in Gephyrin-Clustern. Obwohl PFN1 mit ähnlicher Affinität wie PFN2a Gephyrin *in vitro* bindet (Giesemann et al., 2003), ist diese Profilin-Isoform nur vereinzelt in Gephyrin-Clustern lokalisiert. Der Grad der Co-Lokalisation von PFN1 und Gephyrin entspricht der bereits erwähnten Lokalisationsstudie, in der ein polyklonales anti-PFN1-Serum verwendet wurde (Neuhoff et al., 2005).

Da in den letzten Jahren die Existenz von synaptischen und extra-synaptischen Rezeptor-Gephyrin-Komplexen nachgewiesen werden konnte (Jacob et al., 2005; Charrier et al., 2006; Maas et al., 2006), wurde in dieser Arbeit untersucht, inwiefern PFN2a auch außerhalb von Synapsen mit Gephyrin co-lokalisiert. Bei den extra-synaptischen Gephyrin-Clustern wird in Aggregate unterschieden, deren Rezeptoren in der Plasmamembran gebunden vorliegen und die sich aktiv entlang der Dendriten bewegen (Kneussel & Löbrich, 2007). Echtzeitbeobachtungen und Lokalisationsstudien mit Dynein-spezifischen Antikörpern haben den Nachweis erbracht, dass die sich aktiv bewegende Rezeptor-Gephyrin-Cluster Mikrotubuli-abhängig transportiert werden (Maas et al., 2006). Über die Gerüstproteine von aktiv transportierten Rezeptoren werden meist auch akzessorische Proteine wie z.B. Komponenten von Signalkaskaden oder regulatorische Faktoren gebunden und mittransportiert. (Setou et al., 2000; Verhey et al., 2001). Aufgrund der Abwesenheit von PFN2a in extra-synaptischen Gephyrin-Clustern liegt die Vermutung nahe, dass PFN2a nicht zusammen mit Rezeptor-Gephyrin-Komplexen aus dem Soma in die Dendriten transportiert wird. Stattdessen interagiert PFN2a wohl erst in den inhibitorischen Postsynapsen mit Gephyrin.

Diese spezifische Co-Lokalisation mit synaptischem Gephyrin impliziert eine modulierende Wirkung von PFN2a auf dynamische Vorgänge in den inhibitorischen Synapsen. Hingegen ist ein Einfluss von PFN2a auf die Anzahl der inhibitorischen Synapsen durch die Modifikation des Mikrofilamentsystems nicht zu erwarten, da selbst die vollständige Depolymerisation des Aktin-Cytoskeletts die Anzahl von Rezeptor-Gephyrin-Komplexen nicht verändert (Kirsch & Betz, 1995). Dies stimmt mit Analysen von PFN2a-defizienten Mäusen überein, in denen die Menge inhibitorischer Synapsen unverändert ist (Pilo-Boyl et al., 2007).

Zur Bestimmung der Funktion von Profilin in inhibitorischen Synapsen ist es notwendig, den direkten Einfluss von Profilin auf Gephyrin zu analysieren. Da es sich bei Gephyrin im Gegensatz zu anderen Profilin-Liganden, wie z.B. Ena/VASP-Proteinen (s. Einleitung) nicht um ein Mikrofilament-regulierendes Protein handelt, ist eine direkte Funktion von Gephyrin-Profilin-Komplexen in der Aktin-Dynamik unwahrscheinlich. Denkbar ist, dass Gephyrin analog zu Dynamin 1 durch Profilin in seiner Interaktion mit sich selbst oder anderen Liganden reguliert wird (Gareus et al., 2006).

Da Profilin eine Domäne des Gephyrins besetzen kann, die die Homodimerisierung des Gephyrins vermittelt (Giesemann et al., 2003), könnte durch die Profilin-Bindung die Cluster-Bildung der synaptischen Gephyrin-Moleküle beeinflusst werden. Eine andere Hypothese zur Funktion von Profilin-Gephyrin-Komplexen ergibt sich aus der Art der Interaktion beider Proteine. Gephyrin ist der einzige bekannte Ligand, der neben Aktin und dem Aktin-Verwandten Protein Arp2 über die Aktin-Bindungsdomäne von Profilin gebunden wird (Schutt et al., 1993; Mullins et al., 1998; Giesemann et al., 2003). Somit könnte über die Poly-Prolin-Bindungsregion von Profilin weitere Mikrofilament-assoziierte Proteine an Gephyrin Cluster rekrutiert werden, die die Vorgänge in inhibitorischen Postsynapsen modulieren.

4.1.2 Lokalisation von Profilin 1 und 2a in „dendritic spines“

Neben der Verteilung von Profilin in inhibitorischen Postsynapsen wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob PFN1 und PFN2a unterschiedlich in „dendritic spines“, die die Mehrheit der excitatorischen Synapsen beinhalten (s. Einleitung), lokalisieren. Bisherige Analysen mit GFP-Profilin-Fusionsproteinen, die in einer geringen Anzahl dissoziierter Neurone überexprimiert wurden, wiesen auf eine NMDA-Rezeptor-abhängige Translokation von exogenem PFN2a in „dendritic spines“ hin (Ackermann & Matus, 2003). Im Gegensatz zur dieser Studie wurde in dieser Arbeit die Lokalisation der beiden endogenen Profilin-Isoformen in „dendritic spines“ untersucht. Während Ackermann und Matus (2003) exogenes PFN2a-GFP unter ruhenden Bedingungen fast ausschließlich in den Dendriten vorfinden konnten, betrug in den Analysen dieser Arbeit der Anteil PFN2a-positiven „dendritic spines“ bereits in nicht-stimulierten Neuronen 42%. Dieses Ergebnis stimmt prinzipiell mit Zellfraktionierungsexperimenten mit nicht-stimulierten Neuronen überein, in denen die Bindung von endogenem PFN2a an die „postsynaptic density“ (PSD) excitatorischer Synapsen nachgewiesen werden konnte (s. Einleitung, Schubert et al., 2006). Pilo-Boyl et al. konnten zwar in analogen Analysen PFN2a nicht als Bestandteil der excitatorischen PSD bestätigen. Allerdings zeigten sie anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass PFN2a im Cytoplasma von „dendritic spines“ nicht-stimulierter Neurone lokalisiert (Pilo-Boyl et al., 2007) und stützen damit den in dieser Arbeit erbrachten Nachweis von PFN2a in „dendritic spines“ nicht-stimulierter Neurone.

Darüber hinaus konnten weitere Unterschiede in der NMDA-abhängigen Lokalisationsänderung von exogenen und endogenen Profilinen aufgezeigt werden. Die Stimulierung transfizierter Neurone führte zu einer Akkumulation von PFN2a-GFP in den Köpfen der „dendritic spines“ (Ackermann & Matus, 2003). In den hier vorliegenden Daten konnte kein Hinweis auf eine Akkumulation des endogenen PFN2a beobachtet werden, lediglich eine schwache Zunahme in der Anzahl PFN2a-positiver „dendritic spines“. Zwar erlauben Immunfluoreszenz-Färbungen fixierter Zellen natürlich keine Echtzeitbeobachtung dynamischer Prozesse in ein und denselben Strukturen, dafür existieren aber auch nicht die Artefaktmöglichkeiten, die bei exogenen Proteinen durch GFP-Fusionsanteile oder

nicht-physiologischen Proteinmengen zustande kommen können. Während ein N-terminaler GFP-Fusionsanteil die biochemischen Eigenschaften von PFN2a kaum beeinträchtigt (Wittenmayer et al., 2000), verringert bereits ein C-terminales Epitop-tag die Affinität von PFN2a zu Poly-Prolin-Liganden um mehr als das Hundertfache (Lambrechts et al., 2002). Derart veränderte Eigenschaften können die Lokalisation von exogenen Proteinen beeinträchtigen (Tsakralides et al., 1997; Lalonde et al., 2003). Obwohl sich die Verteilung von PFN2a mit N- und C-terminalem GFP in transfizierten 3T3-Fibroblasten nicht unterschied (Wittenmayer et al., 2000), kann eine veränderte Lokalisation von PFN2a-GFP in Neuronen nicht ausgeschlossen werden. Zudem können exogene Proteine durch eine Überexpression in Kompartimenten lokalisieren, in denen sie unter physiologischen Bedingungen nicht vorliegen. So lokalisiert exogenes Bassoon, das als endogenes Protein einzig in den Aktiven Zonen präsynaptischer Kompartimente zu finden ist (tom Dieck et al., 1998), auch in Axonen, Dendriten und „dendritic spines“ transfizierter Neurone (Dresbach et al., 2003; Takao-Rikitsu et al., 2004; persönliche Mitteilung Nina Wittenmayer (Universität Heidelberg)). Aufgrund solcher Faktoren ist es möglich, dass die von Ackermann und Matus (2003) beobachtete Lokalisationsänderung des PFN2a-GFP nicht das natürliche Verhalten des endogenen PFN2a widerspiegelte. Andererseits könnte durch die Überexpression des PFN2a erst eine Translokation sichtbar werden, die aufgrund der sehr geringen Menge an translozierendem, endogenem Profilin nicht offensichtlich ist.

Neben PFN2a konnte in einigen „dendritic spines“ nicht-stimulierter Neurone PFN1 nachgewiesen werden. Auch dieses Resultat steht im Widerspruch zu den Analysen von Ackermann und Matus (2003), die weder in ruhenden noch stimulierten Neuronen eine Lokalisation von exogenem PFN1-GFP in „dendritic spines“ beobachten konnten. Allerdings ist aus der biochemischen Charakterisierung der GFP-Profilin-Fusionsproteine bekannt, dass PFN1 mit C-terminalem GFP-Fusionsanteil keine Poly-Prolin-Motive bindet (Wittenmayer et al., 2000). Folglich wurden von Ackermann und Matus (2003) ein definitiv eingeschränkt funktionelles PFN1 für *in vivo*-Untersuchungen eingesetzt. Folglich könnte das Fehlen von exogenem PFN1 in „dendritic spines“ durch dessen beeinträchtigtes Ligandenbindungsverhalten erklärt werden.

Dagegen wird der Nachweis von endogenem PFN1 in „dendritic spines“ durch eine Studie bestätigt, in der die Co-Lokalisation einzig von endogenem PFN1 mit dem in excitatorischen Synapsen enthaltenen Marker PSD95 analysiert wurde (Neuhoff et al., 2005). Zudem konnte auch in dieser Arbeit eine Translokation von PFN1 in „dendritic spines“ beobachtet werden. Allerdings weichen die Resultate dieser Arbeit in geringem Umfang von der vorangegangenen Studie von Neuhoff und Mitarbeitern (2005) ab. Durch die Behandlung mit NMDA konnte eine geringe, allerdings statistisch nicht signifikant erhöhte Anzahl PFN1 positiver „dendritic spines“ beobachtet werden. Hingegen führte die Stimulation der Neurone mit Kaliumchlorid zu einer statistisch signifikante Zunahme in der Co-Lokalisation von PFN1 und PSD95 (Neuhoff et al., 2005). Prinzipiell befinden sich die von Neuhoff und Mitarbeitern (2005) beobachteten Lokalisationsveränderungen von endogenem PFN1 im Rahmen der in dieser Arbeit erhaltenen Messwerte.

Eventuell könnte durch eine Erhöhung des Stichprobenumfangs bei der NMDA-Behandlung eine statistisch signifikante Lokalisationsänderung von endogenem PFN1 und PFN2a beobachtet werden. Allerdings stellt sich sowohl für PFN1 als auch PFN2a die Frage, inwiefern eine geringe prozentuale Erhöhung des Anteils Profilin-haltiger „dendritic spines“ entscheidend für aktivitätsabhängige Prozesse in „dendritic spines“ ist.

Letztendlich kann es nicht ausgeschlossen werden, dass in den wenigen „dendritic spines“ mit NMDA-Rezeptor-abhängiger Profilin-Translokation im Zuge synaptischer Plastizität das Aktin-Cytoskelett reorganisiert wird. Da in dieser Arbeit hippocampale Neurone als Modellsystem gewählt wurden, kann keine Aussage über eine mögliche Translokation von Profilin in Neuronen anderer Regionen des ZNS getroffen werden. Möglicherweise ist in anderen Hirnarealen wie z.B. der Amygdala die Translokation der Profiline in „dendritic spines“ stärker ausgeprägt (Lamprecht et al., 2006). Unabhängig von den gegensätzlichen Resultaten zur NMDA-abhängigen Profilin-Translokation konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass überwiegend PFN2a in Profilin-haltigen „dendritic spines“ vorhanden ist.

4.1.3 Funktionen von Profilin 2a in excitatorischen Postsynapsen

Die zuvor durch Immunfluoreszenzen gezeigte Präsenz von endogenem PFN2a in „dendritic spines“ wirft die Frage auf, wie diese Profilin-Isoform das Aktin-Cytoskelett an excitatorischen Postsynapsen beeinflusst. Ackermann und Matus (2003) postulierten anhand von Überexpressionsexperimenten, dass PFN2a die Aktin-Dynamik in den Köpfen der „dendritic spines“ hemmt und somit deren Morphologie konstant hält. Bei der Interpretation dieser Resultate ist jedoch zu beachten, dass die Wirkung von Profilin auf das Aktin-Cytoskelett Dosis-abhängig ist. Sobald Profilin im Überschuss vorliegt, hemmt es die Aktin-Nukleation und folglich die Aktin-Dynamik (Bubb et al., 2003). Dagegen bewirken moderate Profilin-Konzentrationen eine Zunahme in der Aktin-Filamentbildung, in dem es den Nukleotidaustausch beschleunigt und optimal orientierte Aktin-Monomere an die Plus-Enden von Aktin-Filamenten transferiert (Selden et al., 1999; Yarmola & Bubb, 2004; Minehardt et al., 2006; Jockusch et al., 2007). Deutlich wird dies bereits bei *in vitro*-Experimenten wie z.B. Aktin-Polymerisationskinetiken. Der Überschuss an Profilin in solchen Experimenten hemmt die Aktin-Polymerisation (siehe Kapitel 3.3.9, Harbeck et al., 2000; Bubb et al., 2003). Eine geringere Menge an Profilin bewirkt in Kombination mit rekombinantem VASP anstelle einer Inhibition eine deutliche Förderung der Aktin-Polymerisation (Harbeck et al., 2000; Barzik et al., 2005). Ein weiterer Beleg für den positiven Effekt von Profilin auf die Aktin-Dynamik sind Experimente mit Listerien, die die Aktin-Polymerisation zur intrazellulären Fortbewegung nutzen (Grenklo et al., 2003). Die Fortbewegung dieser Pathogene wird inhibiert, wenn Profilin über Antikörper gebunden wird (Theriot et al., 1994). Analog zu PFN1 erhöht auch PFN2a die Aktin-abhängige Motilität von Listerien (Geese et al., 2000).

In Kooperation mit Kristin Michaelsen (TU Braunschweig) wurde der Einfluss von PFN2a auf die „dendritic spines“ sowie die dendritische Komplexität mithilfe des „Knock down & Knock in“-Vektorsystems untersucht. Der Knock down von PFN2a reduziert signifikant in den basalen und mid-apikalen Dendriten der CA1-Neuronen die Dichte der „dendritic spines“ und die dendritische Komplexität. Die Spezifität dieses Resultats belegt die Rekonstitution der dendritischen Morphologie, wenn endogenes PFN2a durch RNAi ausgeschaltet und gleichzeitig gegen funktionelles YFP-PFN2a substituiert wird. Im Gegensatz zur Hypothese von Ackermann und Matus (2003) bewirkt PFN2a somit keine Hemmung der Aktin-Dynamik. In diesem Fall hätte der Verlust von PFN2a wohl aufgrund einer verbesserten Aktin-Dynamik zu einer Erhöhung der dendritic spine-Dichte geführt.

Obwohl PFN2a in der Neuritogenese differenzierender Neurone keine entscheidende Rolle zu spielen scheint (Pilo-Boyl et al., 2007), reguliert es die Morphologie der basalen und mid-apikalen Dendriten in reifen CA1-Neuronen. Hierbei ist auffällig, dass der durch den Verlust von PFN2a bedingte Rückgang der „dendritic spines“ und der dendritischen Verzweigungen zusammen in spezifischen Regionen auftreten.

Somit scheint eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Lokalisation von endogenem PFN2a in „dendritic spines“ und den funktionellen Analysen mit dem „Knock down & Knock in“-System zu existieren. Die Lokalisationsstudien mit den Profilin-spezifischen Antikörpern deuten daraufhin, dass PFN2a nur in einer bestimmten Population von „dendritic spines“ vorhanden ist. Da bei diesen Analysen dissoziierte Neuronen verwendet wurden, konnten die Profilin-positiven „dendritic spines“ nicht mit Sicherheit einem bestimmten Kompartiment oder einem spezifischen Neuron-Zelltyp zugeordnet werden. Aufgrund der Ergebnisse der „Knock down & Knock in“-Analysen liegt die Schlussfolgerung nahe, dass im Fall der CA1-Neurone die PFN2a enthaltenden „dendritic spines“ auf die Regionen der basalen und mid-apikalen Dendriten beschränkt sein könnten.

Immunhistochemische Analysen haben gezeigt, dass die durch den Verlust von PFN2a betroffenen Dendriten im Hippocampus in Kontakt mit den Schaffer-Kollateralen der CA3-Neurone stehen (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994). Die in größerer Entfernung zum Soma vorliegenden, apikalen Bereiche der Dendriten, die Signale aus dem entorhinalen Cortex empfangen, sind nicht durch den PFN2a-Verlust betroffen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass PFN2a das Mikrofilamentsystem in spezifischen Dendriten positiv reguliert, die einen distinkten, synaptischen Input erhalten. Anhand der untersuchten CA1-Neuronen könnte gemutmaßt werden, dass PFN2a durch lokal begrenzte, strukturelle Veränderungen der dendritischen Morphologie die Signalweiterleitung innerhalb des Hippocampus beeinflusst. Bisher fehlen jedoch generell die entsprechenden experimentellen Belege, die einen funktionalen Zusammenhang zwischen den lokalen Veränderungen der dendritischen Morphologie und den spezifischen synaptischen Signalen herstellen (Spruston et al., 2008).

Allerdings zeigten PFN2a-defiziente Mäusen in ersten elektrophysiologischen Experimenten keine Unterschiede sowohl in der Verstärkung („long term potentiation“ - LTP) als auch Schwächung („long term depression“ - LTD) synaptischer Verbindungen.

In der relevanten Arbeit von Pilo-Boyl et al. (2007) wurde daher postuliert, dass der verhaltensauffällige Phänotyp von PFN2a-defizienten Mäusen größtenteils auf präsynaptischen Prozessen beruht. Diese Hypothese scheint im Gegensatz zu den mit dem „Knock down & Knock in“-Vektorsystem erzielten Resultaten zu stehen.

Eine Möglichkeit für die fehlende Beeinträchtigung von LTP und LTD in PFN2a-Knock out-Mäusen ist eine Kompensation des Genverlustes durch die veränderte Expression anderer Gene von z.B. redundant wirkenden Proteinen. Dieses Phänomen tritt vor allem bei konventionell generierten Knock-out-Mäusen auf, in denen das zu untersuchende Gen permanent deletiert ist. Beispielsweise wurden kompensatorischen Mechanismen, die zu unauffälligen Phänotypen in Mäusen geführt haben, bei konventionellem „gene-targeting“ z.B. des „cAMP response element-binding-Proteins (CREB)“ (Hummler et al., 1994; Blendy et al., 1996; Balschun et al., 2003) und einer Isoformen der metabotropen Glutamatrezeptoren (Lyon et al., 2008) nachgewiesen.

Zwar haben Expressionsanalysen gezeigt, dass mit dem Verlust von PFN2a keine erhöhte Expression von PFN1 verbunden war (Pilo-Boyl et al., 2007). Allerdings sind neben der Expression weiterer Isoformen noch andere Mechanismen zur Kompensation eines Genverlustes möglich. So reagiert das ZNS von Mäusen auf den genetischen Verlust der $\alpha 1$ -Untereinheit der GABA-Rezeptoren mit der erhöhten Ausschüttung von GABA (Ortinski et al., 2006). Analog könnte der Verlust von PFN2a durch eine veränderte Expression und/oder Regulation anderer Mikrofilament-assoziiierter Profilin-Liganden kompensiert werden. So ist aus biochemischen Analysen bekannt, dass Ena/VASP-Proteine, WASP und die Formine (s. Einleitung) auch ohne Profilin die Nukleation von Aktin-Filamenten katalysieren können, wenn auch mit geringerer Effizienz (Yang et al., 2000; Takenawa & Miki, 2001; Barzik et al., 2005; Romero et al., 2007; Paul & Pollard, 2008). Als Ausgleich für den PFN2a-Verlust könnte die Konzentration dieser Proteine in PFN2a-defizienten Mäusen erhöht sein. Zusätzlich könnten inhibitorische Regulationsmechanismen, die auf diese Proteine wirken, in PFN2a-defizienten Mäusen außer Funktion gesetzt sein. Dies könnte die Protein-Kinase A-abhängige Phosphorylierung von Ena/VASP-Proteinen betreffen, die die Aktin-Nukleation dieser Proteine hemmt (Harbeck et al., 2000; Lambrechts et al., 2000). Zusätzlich könnten die Formine über Veränderungen im Rho-Signalweg sich vermehrt in einer aktiven Konformation befinden (Watanabe et al., 1997; Krebs et al., 2001; Otomo et al., 2005). Die Aktivierung von potenziell kompensatorischen Mechanismen wurde in dieser Arbeit durch den Einsatz des „Knock down & Knock in“-Systems verhindert, durch das PFN2a spontan in differenzierten Neuronen ausgeschaltet bzw. direkt substituiert wurde.

Abgesehen von möglichen kompensatorischen Mechanismen in PFN2a-defizienten Mäusen belegen mehrere Studien, dass die verschiedenen Prozesse der postsynaptischen Plastizität wie die Insertion und Akkumulation von Rezeptoren und die Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts in „dendritic spines“ distinkte Vorgänge sind. So konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte synaptische Übertragung nicht simultan mit der Vergrößerung der „dendritic spines“ erfolgen muss.

Bei einer chemischer Induktion von LTP konnte beobachtet werden, dass sich die „dendritic spines“ bereits vor Beginn der Insertion weiterer AMPA-Rezeptoren in die PSD vergrößerten (Kopeck et al., 2006). Pharmakologische Experimente mit Cytotoxinen haben zudem gezeigt, dass die Depolymerisation des Aktin-Cytoskeletts die LTP-abhängige Verstärkung von Postsynapsen verhindert (Fukazawa et al., 2003; Krucker et al., 2005). Hingegen führt die bloße Behandlung von Neuronen mit Aktin-Polymerisation-fördernden Jasplakinoliden zu einer Vergrößerung der „dendritic spines“, wobei jedoch die synaptische Transmission nicht verstärkt wird (Okamoto et al., 2004). Somit ist die Aktin-Polymerisation für die Entstehung von LTP von großer Bedeutung, jedoch nicht ausreichend.

Entsprechende Ergebnisse wurden auch bei der Untersuchung der negativen synaptischen Plastizität anhand von Cofilin/ADF erzielt. Cofilin/ADF, die die Depolymerisation von Aktin-Filamenten fördern (Huang et al., 2006), sind essentiell für die Verkleinerung der „dendritic spines“. Die Inhibition der Cofilin/ADF-abhängigen Verkleinerung von „dendritic spines“ führt jedoch nicht zur Beeinträchtigung der LTD-spezifischen, synaptischen Transmissionen (Zhou et al., 2004).

Analog zur Rolle von Cofilin/ADF im LTD-bedingten Rückgang der „dendritic spines“ muss der Verlust von PFN2a nicht zwangsläufig mit Defekten in der funktionellen synaptischen Plastizität einhergehen. Folglich müssen die in dieser Arbeit erzielten Resultate nicht im direkten Gegensatz zu den Ergebnissen von Pilo-Boyl et al. (2007) stehen. Außerdem wird die Spezifität der Resultate bezüglich einer postsynaptischen Funktion von PFN2a durch den Einsatz von Bindungsmutanten hervorgehoben.

4.1.4 Regulation der dendritischen Morphologie durch die Interaktion von Profilin 2a mit G-Aktin und Poly-Prolin-Liganden

Durch die erstmalige Generierung, Charakterisierung und *in vivo*-Analyse einer G-Aktin-Bindungsmutante von PFN2a konnte gezeigt werden, dass der positive Effekt von PFN2a auf die dendritische Morphologie auf dessen direkter Interaktion mit G-Aktin beruht. Folglich weist PFN2a Parallelen zu PFN1 in nicht-neuronalen Zellen auf: So kann PFN1 die epitheliale Wuchsform von Brustkrebszellen nur normalisieren, wenn dessen Aktin-Bindung nicht beeinträchtigt ist (Wittenmayer et al., 2004; Rosan, 2007; Zou et al., 2007).

Während die Substitution des endogenen PFN2a gegen eine Aktin-Bindungsmutante zu einer reduzierten Anzahl von „dendritic spines“ und dendritischen Verzweigungen führt, bewirkt die Expression einer Poly-Prolin-Bindungsmutante von PFN2a keine Beeinträchtigungen in der dendritischen Komplexität. Stattdessen erhöht die Expression dieser PFN2a-Variante signifikant die Dichte der „dendritic spines“. Einen analogen Effekt beobachteten Ackermann & Matus (2003) durch die Co-Expression von PFN2a-YFP und eines Peptids, das die Profilin-Bindungsregion von VASP

beinhaltete. Bei diesen Experimenten kam es zur Bildung abnorm verlängerter „dendritic spines“, denen meist die charakteristische kopfartige Morphologie fehlte (Ackermann & Matus, 2003).

Die Verstärkung des positiven Effekts von PFN2a auf die Dichte der „dendritic spines“ zeigt, dass durch die Inhibition der Poly-Prolin-Bindung von PFN2a ein auf die Aktin-Dynamik begrenzend wirkender Mechanismus außer Funktion gesetzt wird.

Im Wesentlichen sind zwei Profilin-spezifische Wirkungsweisen denkbar: Analog zur Interaktion mit Dynamin 1 (Gareus et al., 2006) könnte PFN2a über die Poly-Prolin-Bindung einen unbekannten Liganden inaktivieren, der seinerseits die Aktin-Dynamik positiv beeinflusst. Diese Hypothese schließt prinzipiell die in „dendritic spines“ lokalisierenden Proteine Mena (Rostaing et al., 2006), N-WASP (Wegner et al., 2008) und WAVE (Soderling et al., 2003) aus. Diese Liganden benötigen zur Förderung der Aktin-Polymerisation die Interaktion mit dem Profilaktin-Komplex, der über die Poly-Prolin-Bindungsdomäne mit diesen Proteinen wechselwirkt (Yang et al., 2000; Takenawa & Miki, 2001; Ferron et al., 2007).

Ein weiterer Profilin-Ligand, der in „dendritic spines“ lokalisiert, ist Drebrin (Mammoto et al., 1998; Majoul et al., 2007). Drebrin ist ein F-Aktin-bindendes Protein, das im Gegensatz zu anderen Aktin-bindenden Proteinen die Bildung von Aktin-Filamenten nicht beeinflusst. Stattdessen verändert Drebrin die Suprastrukturen der Aktin-Filamente, in dem es mit F-Aktin-bündelnden Proteinen kompetitiert (Ishikawa et al., 1994; Sasaki et al., 1996). Die Überexpression von Drebrin führt in Neuronen zu abnorm verlängerten „dendritic spines“ (Hayashi & Shirao, 1999; Biou et al., 2008). Hingegen bewirkt die Inhibition der Drebrin-Expression zu einer verminderten Dichte der „dendritic spines“ (Takahashi et al., 2003; Biou et al., 2008). Die Poly-Prolin-reiche Region des Drebrins, die wahrscheinlich der Interaktion mit Profilin dient, befindet sich in der Nähe der zentral gelegenen Aktin-Bindungsdomäne (Hayashi et al., 1999). Möglicherweise wird die Aktin-Bindung von Drebrin durch die Interaktion mit Profilin moduliert.

Ein anderer Mechanismus könnte auf dem positiven Effekt basieren, den PFN2a selbst auf das Mikrofilamentsystem ausübt. Durch die Mutationen in der Poly-Prolin-Bindung kann PFN2a möglicherweise nicht mit einem Profilin-Liganden interagiert, der die Aktin-Bindung von PFN2a inhibiert. Ein solcher Ligand könnten die „Rho-associated kinases (ROCK)“ sein. Diese Kinasen werden durch die GTPase RhoA aktiviert und wurden als Bindungspartner von PFN2a identifiziert (Witke et al., 1998; Schmandtke et al., 2008). Zudem konnte eine Phosphorylierung von PFN1 und PFN2a durch ROCK *in vivo* nachgewiesen werden (Da Silva et al., 2003; Shao et al., 2008). Die ROCK-abhängige Phosphorylierung von PFN1 inhibiert dessen Interaktion mit G-Aktin und Poly-Prolin-Liganden (Shao et al., 2008). Die Voraussetzung für eine ROCK-abhängige Phosphorylierung von PFN1 ist dessen funktionelle Poly-Prolin-Bindung. Falls das Ligandenbindungsverhalten von PFN2a durch eine ROCK-abhängige Phosphorylierung gleichermaßen beeinflusst wird, können die durch die Expression der PFN2a-Bindungsmutante verursachten Veränderungen der „dendritic spines“

erklärt werden. Durch die Mutationen in der Poly-Prolin-Bindungsdomäne kann PFN2a wahrscheinlich nicht mehr mit ROCK interagieren und folglich nicht phosphoryliert werden.

Zwar kann diese PFN2a-Mutante nicht zusammen mit Poly-Prolin-Liganden wie Mena oder Forminen direkt die Aktinfilament-Bildung unterstützen (Kursula et al., 2008). Allerdings bindet dieses mutierte Profilin immer noch G-Aktin. Möglicherweise ist der PFN2a-vermittelte Nukleotidaustausch an den Aktin-Monomeren ausreichend, um die Aktin-Polymerisation zu fördern und vermehrt „dendritic spines“ entlang der Dendriten entstehen zu lassen.

4.1.5 Profilin als möglicher Effektor von neuronalen Signalkaskaden?

Die Morphologie der „dendritic spines“ und Dendriten wird in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität wie z.B. bei Lern- und Gedächtnisprozessen modifiziert (Maletic-Salavtic et al., 1999; Kasai et al., 2003; Knott et al., 2006; Sorensen & Rubel, 2006). Außerdem sind diese Strukturen bei Erkrankungen mit mentaler Retardierung wie dem Down- und Rett-Syndrome sowie Autismus abnorm verändert (Armstrong et al., 1995; Raymond et al., 1995; Kaufmann & Moser, 2000,). Mit dem in dieser Arbeit erbrachten Beleg einer Aktin-abhängigen Regulation der dendritischen Morphologie durch PFN2a stellt sich die Frage, wie Profilin in solche neuronale Prozesse involviert sein könnte.

Auf der Grundlage der in dieser Arbeit festgestellten positiven Funktion von PFN2a auf die „dendritic spines“ und die dendritische Komplexität existieren verschiedene Möglichkeiten für die Einbindung von PFN2a in Signalwege. Einerseits sind Signalkaskaden denkbar, die bei positiver struktureller Plastizität PFN2a aktivieren und somit das Mikrofilamentsystem hin zur verstärkten Bildung von „dendritic spines“ und dendritischen Verzweigungen reorganisieren. Andererseits könnten auch Signalwege existieren, die zur Schwächung von Synapsen PFN2a inhibieren. Zudem muss wohl bedacht werden, dass Profilin direkt oder indirekt über die Aktivität seiner Liganden an Signalwegen beteiligt sein könnte.

Eine direkte Signal-abhängige Regulation von PFN2a könnte über Signalwege erfolgen, die auf Neurotrophinen basieren. Neurotrophine stellen eine Gruppe sekretorischer Proteine dar, die ursprünglich anhand ihrer positiven Wirkung auf das Überleben neuronaler Zellen identifiziert wurden. Im Lauf der letzten Jahre wurde zudem entdeckt, dass Neurotrophine in vielerlei Hinsicht die neuronale Differenzierung beeinflussen. Dies gilt insbesondere für die Bildung und Plastizität von Synapsen (Bibel & Barde, 2000; Lu et al., 2005; Skaper, 2008). In Mammalia werden vier Neurotrophine exprimiert: der „neuronal growth factor (NGF)“, der „brain-derived neurotrophic factor (BDNF)“, Neurotrophin-3 (NT) und Neurotrophin-4 (NT-4), die durch Proteolyse zu reifen Proteinen prozessiert werden (Reichardt, 2006). Diese verschiedenen Neurotrophine aktivieren spezialisierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die Trk-Rezeptoren: NGF bindet spezifisch Trk A, während BDNF und NT-4 mit TrkB interagiert. NT-3 wechselwirkt spezifisch mit Trk-C (Huang & Reichardt, 2003). All diese Trk-Rezeptoren setzen Prozesse in Neuronen in Gang, die das Überleben und die

Differenzierung sowie die Bildung von Synapsen unterstützen (Reichardt, 2006). Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass bei LTP-Induktion über BDNF und TrkB eine verstärkte Aktin-Polymerisation in „dendritic spines“ erfolgt (Rex et al., 2007). An dieser Trk-Rezeptor abhängigen Reorganisation des Mikrofilamentsystems könnte PFN2a beteiligt sein: Aus den Analysen der molekularen Mechanismen der Trk-Rezeptor-Signalwege ist bekannt, dass über die Trk-Rezeptoren die Phospholipase $C\gamma 1$ (PLC- $\gamma 1$) aktiviert wird (Zirrgiebel et al., 1995; Gärtner et al., 2006). Bisher wurde überwiegend die Trk-Rezeptor-abhängige Aktivierung der PLC- $\gamma 1$ mit Signalwegen in Verbindung gebracht, die mittels der Protein Kinase C (PKC) die Genexpression und die Neurotrophin-Sekretion in Neuronen regulieren (Toledo-Aral et al., 1995; Canossa et al., 2001; Minichiello et al., 2002; Klein et al., 2005). Jedoch konnte in Epithelzellen gezeigt werden, dass die über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktivierte Phospholipase $C\gamma 1$ PIP₂-gebundenes Profilin von der Membran freigesetzt wird (Goldschmidt-Clermont et al., 1990; 1991). Analog könnte in Neuronen über die Trk-Rezeptoren die Phospholipase $C\gamma 1$ aktiviert werden, welche PIP₂-gebundenes Profilin für die Organisation des Aktin-Cytoskeletts mobilisiert (Abb. 4.1).

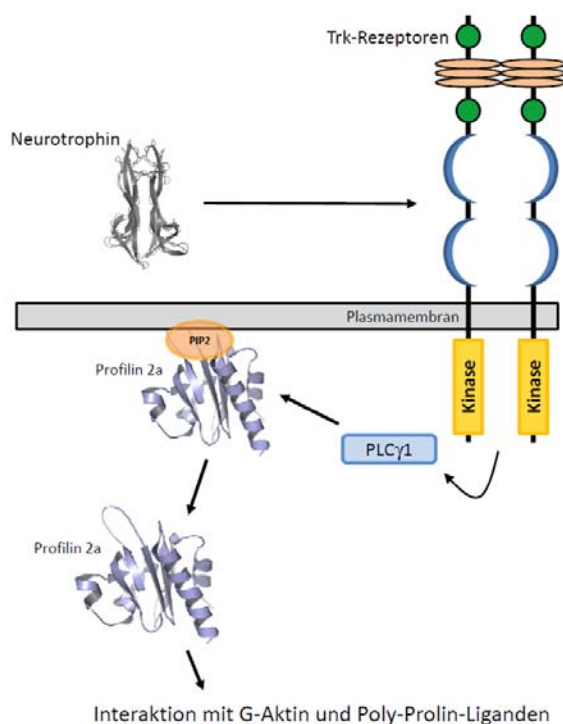


Abb. 4.1: Hypothese zur Aktivierung von Profilin 2a durch Trk-Rezeptoren

Die Bindung von Neurotrophinen führt zur Dimerisierung der Trk-Rezeptoren, die durch Trans-Phosphorylierung die cytoplasmatische Kinase-Domänen aktivieren. Diese aktivieren durch Phosphorylierung die Phospholipase $C\gamma 1$ (PLC- $\gamma 1$). Die aktivierte PLC- $\gamma 1$ hydrolysiert PFN2a-gebundenes PIP₂, wodurch PFN2a zur Interaktion mit G-Aktin und Poly-Prolin-Liganden freigesetzt wird.

Diese Mobilisierung könnte zu den Veränderungen in der Aktin-Dynamik führen, die bei der LTP-Induktion in „dendritic spines“ beobachtet wurde (Fukazawa et al., 2003; Okamoto et al., 2004; Lin et al., 2005).

Eine Regulation von Profilin könnte außerdem über den p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75-NTR) erfolgen. Dieser Rezeptor bindet alle Neurotrophine, wobei die höchste Affinität zu den nichtprozessierten Vorläufer-Molekülen besteht (Lee et al., 2001). Im Gegensatz zu den Trk-Rezeptoren können über den p75-Rezeptor verschiedenste Prozesse in Gang gesetzt werden.

Diese reichen von trophischen Effekten analog zu den Trk-Rezeptoren bis hin zur Induktion der Apoptose neuronaler Zellen (Blöchl & Blöchl, 2007).

Während Trk-Rezeptoren von maßgeblicher Bedeutung für die positive synaptische Plastizität sind, ist der p75-Rezeptor in die LTD-vermittelten Schwächung von Synapsen involviert (Rösch et al., 2005; Woo et al., 2005). Darüber hinaus wirkt der p75-Rezeptor inhibierend auf die Axonbildung und dendritische Komplexität von Neuronen (Yamashita et al., 1999; Zagrebelsky et al., 2005). Die p75-Rezeptor-vermittelte Modulation des Aktin-Cytosketts erfolgt unter anderem durch die Regulation der GTPase RhoA, die das Neuritenwachstum in neuronalen Zelllinien und primären Neuronen hemmt (Yamashita et al., 1999, 2002). Durch die Inhibition der positiven Wirkung des Profilins auf die dendritische Morphologie könnte über einen RhoA-abhängigen Signalweg erfolgen, an dessen Anfang der p75-Rezeptor steht (Abb. 4.2).

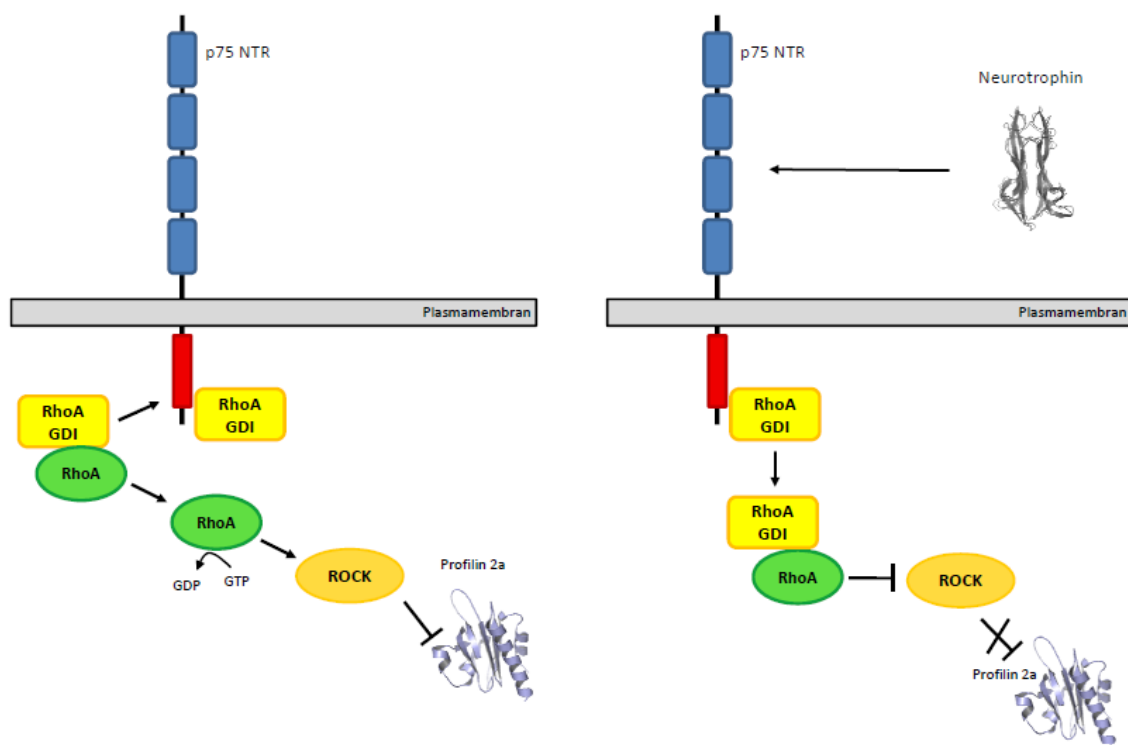


Abb. 4.2: Hypothetisches Modell zur Regulation von Profilin 2a durch den p75-Neurotrophin-Rezeptor

Nicht-stimulierte p75-Rezeptoren rekrutieren Rho-GDI, was zur Freisetzung von RhoA-GDP führt. Im Cytoplasma erfolgt die Nukleotidaustausch-bedingte Aktivierung von RhoA. RhoA-GTP aktiviert ROCK, die über die Poly-Prolin-Bindungsdomäne mit Profilin 2a interagiert und dieses durch Phosphorylierung inaktiviert (A). Die Bindung von Neurotrophinen an p75 bewirkt die Dissoziation des Rho-GDI. Der freie Rho-GDI bindet RhoA-GDP und hält dieses im inaktiven Zustand. Durch die Verringerung des Anteils von freiem RhoA-GTP wird ROCK inaktiviert. Durch den Verlust der Kinase-Aktivität von ROCK kann Profilin 2a vermehrt mit seinen Liganden interagieren und die Aktin-Dynamik beeinflussen (B).

In Abhängigkeit der Interaktion des p75-Rezeptors mit Neurotrophine könnte PFN2a in seinem aktiven Zustand begünstigen sein. Durch die Bindung von Neurotrophinen an den p75-Rezeptor wird die Dissoziation des Rho-GDI ausgelöst (Yamashita & Toyhama, 2003). Der freigesetzte Rho-GDI bindet und inaktiviert seinerseits RhoA, was zu einer Inhibition von ROCK führt.

Durch die Aktivität einer unbekannten Phosphatase würde PFN2a überwiegend dephosphoryliert vorliegen und somit die Aktin-Dynamik positiv beeinflussen (Abb. 4.3). Durch die Balance der Trk- und p75-Rezeptoren, die Assoziation der Rezeptoren mit weiteren regulatorisch wirkenden Proteinen und die Neurotrophin-Konzentration könnte die Aktivität von PFN2a in Neuronen bestimmt werden (Lee et al., 2001; Harrington et al., 2004; Blöchl & Blöchl, 2007).

An einer Modulation der Profilin-Aktivität könnten neben Neurotrophin-Rezeptoren auch Glutamat-Rezeptoren beteiligt sein. Aktiviertes RhoA interagiert direkt mit ionotropen Glutamat-Rezeptoren in der postsynaptischen Dichte von „dendritic spines“ (Schubert et al., 2006). Im Gegensatz zu dem Modell der RhoA-Aktivierung durch den p75-Rezeptor postulieren Schubert et al., dass in excitatorischen Synapsen bei geringer synaptischer Transmission GTP-gebundenes RhoA zusammen mit ROCK und PFN2a an NMDA-Rezeptoren gebunden vorliegt. Über diesen Komplex soll PFN2a nahe der postsynaptischen Dichten in einem inaktiven Zustand gehalten werden. Durch die Stimulierung ionotropen Glutamat-Rezeptoren soll RhoA freigesetzt und durch die GTP-Hydrolyse inaktiviert werden. Folglich verringert sich die Menge an aktivem RhoA nahe der PSD, wodurch ROCK eher in einem inaktiven Zustand vorliegt. Ohne die inhibitorisch wirkende Phosphorylierung könnte PFN2a in der Lage sein, die Aktin-Dynamik bei positiver struktureller Plastizität zu modulieren (Abb. 4.3).

Parallel zur negativen Regulation von PFN2a könnte Cofilin bzw. der homologe „Actin depolymerization factor“ ADF aktiviert werden. Durch einen geringen Calcium-Einstrom wird die Phosphatase Calcineurin aktiviert (Abb. 4.4; Halpain et al., 1998; Zhou et al., 2004), die ihrerseits durch Dephosphorylierung Cofilin/ADF aktiviert. Aufgrund der Inhibition von Profilin bestehen die Aktin-Filamente nahe der postsynaptischen Dichte größtenteils aus ADP-Aktin und können daher effektiv durch Cofilin/ADF depolymerisiert werden. Im Gegenzug könnte bei einer LTP-bedingten hohen Aktivierung der NMDA-Rezeptoren nicht nur PFN2a aktiv sein, sondern auch simultan Cofilin durch eine LIM-Kinase (LIMK)-abhängige Phosphorylierung inhibiert vorliegen (Abb. 4.3, Nagoaka et al., 1996, Meng et al., 2002; Park et al., 2003).

Neben der direkten Aktivierung oder Inhibition von Profilin durch Signalwege, besteht die Möglichkeit, dass anstelle von Profilin seine Liganden über Signalwege reguliert werden. So werden z.B. durch eine TrkB-Rezeptor-MAP-Kinase-Signalkaskade Komplexe bestehend aus Cortactin, Arp2/3 und N-WASP in „dendritic spines“ rekrutiert (Iki et al. 2005; Lua & Low, 2005). Lokal konzentriert könnten Arp2/3 und N-WASP die Bildung neuer Aktin-Filamente bewirken (Takenawa & Miki, 2001). Profilin wäre insofern in diesen Signalweg involviert, da es von diesen Proteinen für eine effektive Aktinfilament-Bildung benötigt wird (Yang et al., 2000).

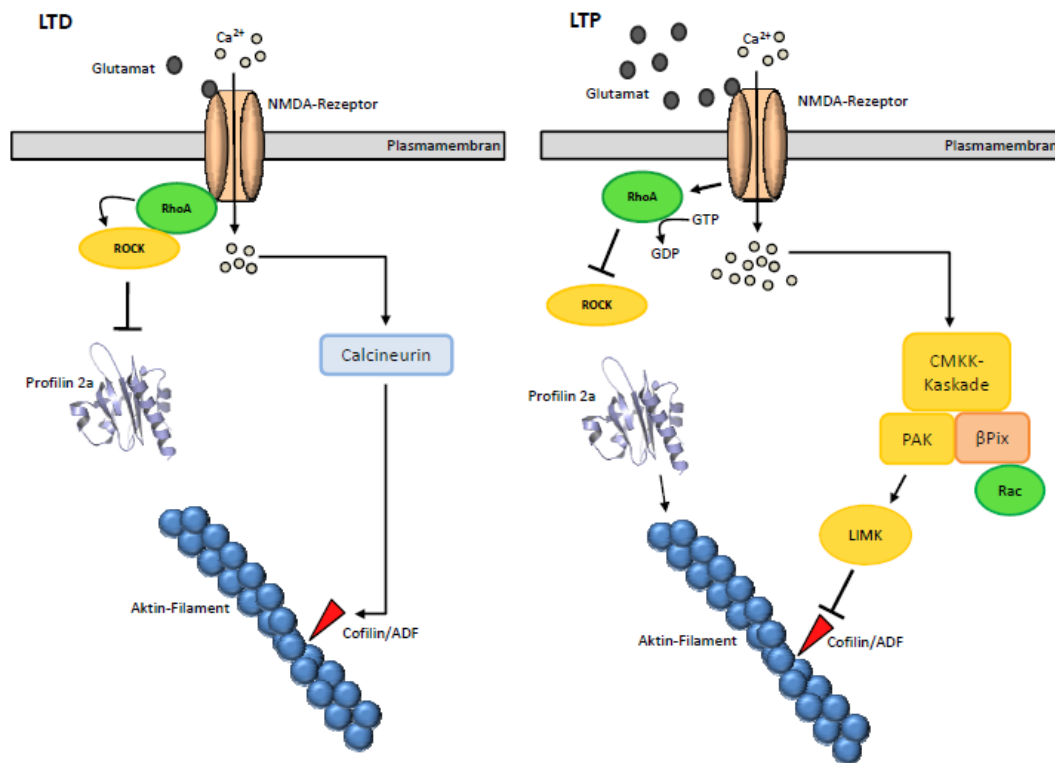


Abb. 4.3: Modell zur Glutamat-Rezeptor-RhoA-abhängigen Regulation von PFN2a und Cofilin/ADF

Bei LTD bedingter, geringer synaptischer Aktivität bindet RhoA-GTP direkt an ionotrope Glutamat-Rezeptoren. Lokal wird über Rezeptor-gebundenes RhoA-GTP ROCK rekrutiert und aktiviert. Dies könnte nahe der postsynaptischen Dichte zur Inaktivierung von Profilin 2a führen. Gleichzeitig wird durch einen geringen Calcium-Ionen-Einstrom die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin dephosphoryliert Cofilin/ADF, die somit die Depolymerisation der Aktin-Filamente beschleunigen (links). Bei LTP führt die hohe synaptische Transmission zur Dissoziation von RhoA-GTP. Durch die GTPase-Aktivität liegt RhoA inaktiv vor und ist zudem geringer in der postsynaptischen Dichte konzentriert. Durch den Mangel an aktivem RhoA wird die Kinase-Aktivität von ROCK inhibiert, wodurch PFN2a hauptsächlich unphosphoryliert nahe der PSD vorliegt und positiv die Aktin-Dynamik beeinflusst. Gleichzeitig wird durch einen vermehrten Einstrom der CAM-Kinase-Kinase (CMKK)-Signalweg aktiviert. Dieser führt unter Beteiligung von β Pix und Rac zur Aktivierung der PAK-Kinase. In Folge wird die LIM-Kinase aktiviert, die Cofilin/ADF phosphoryliert und somit inaktiviert (rechts).

Die vorgestellten Signalwege stellen denkbare Möglichkeiten dar, wie Profilin in neuronale Prozesse integriert sein könnte. Für weiterführende Studien gilt es zudem, herauszufinden, wie solche Mechanismen in Neuronen die Aktivität von Profilin Kompartiment-spezifisch regulieren können.

4.1.6 Kernlokalisierung von Profilin 1 und 2a in Neuronen

Die zuvor genannten Rezeptoren, die direkt oder indirekt die cytoplasmatische Funktion von PFN2a beeinflussen könnten, stehen am Anfang weiterer Signalwege, die letztendlich im Zellkern die Transkription von Genen beeinflussen.

Am Ende dieser Signalkaskaden befinden sich Mediatoren, die nach ihrer Aktivierung in den Zellkern translozieren und dort die Transkription von Zielgenen regulieren (Reichardt, 2006, Saha & Dudek, 2008). Für exogenes PFN2a-GFP konnte ebenfalls eine NMDA-Rezeptoren-abhängige Translokation in die Zellkerne von Neuronen beobachtet werden (Birbach et al., 2006). Diese Lokalisationsänderung wurde zudem als schnell und reversibel beschrieben, so dass mit Beendigung der NMDA-Rezeptor-Stimulation PFN2a den Zellkern wieder verlässt. Analog zur Untersuchung der Profilin-Lokalisation in „dendritic spines“ wurde in dieser Arbeit analysiert, ob endogenes Profilin ebenfalls Aktivitäts-abhängig in den Zellkern transloziert. Im Gegensatz zu der zuvor genannten Studie wurde PFN2a bereits in nicht-stimulierten Neuronen mit nahezu gleicher Konzentration wie im Cytoplasma in den Zellkernen nachgewiesen. Die chemische Stimulation der NMDA-Rezeptoren zog in nur wenigen Zellen eine Erhöhung der PFN2a-Menge nach sich. Endogenes PFN1, das in geringerem Maße als PFN2a in den Zellkernen von Neuronen vorhanden ist, zeigte keinerlei stimulationsabhängige Veränderungen in seiner Lokalisation. Im Vergleich zu der deutlichen Serum-abhängigen Translokation von PFN1 in Hühnerfibroblasten (Kapitel 3.4.4) ist es fraglich, inwiefern die in Neuronen gemessenen Unterschiede eine NMDA-abhängige Translokation von endogenem Profilin darstellen.

Somit besteht auch in der Kernlokalisierung Diskrepanzen zwischen exogenem PFN2a-GFP und endogenem PFN2a. Angesichts der geringen Größe sowie der kompakten Struktur der Profileine können beide endogenen Isoformen durch Diffusion in den Kern gelangen. Die von Birbach et al. verwendeten GFP-Profilin-Fusionsproteine befinden sich mit einer molekularen Masse von 42 kDa nahe der maximalen Molekülgröße, mit der Proteine passiv die Kernporen passieren können (Becskei & Mattaj, 2005). Somit wäre vorstellbar, dass exogenes PFN2a-GFP im Gegensatz zu endogenem PFN2a einen aktiven Transport über Importine benötigt. Eine solche Abhängigkeit würde auch mit der Beobachtung korrelieren, dass Importine verstärkt durch die Stimulation der NMDA-Rezeptoren in die Zellkerne translozieren (Thompson et al., 2004). Allerdings haben Studien zum Exportin-6-vermittelten Export von Profilaktin-Komplexen gezeigt, dass GFP-Profileine in die Zellkerne diffundieren können (Stüven et al., 2003). Diese Diskrepanz in der Lokalisation zwischen exogenem und endogenem PFN2a ist somit nicht leicht zu erklären. Allerdings wird die in dieser Arbeit gezeigte Kernlokation des endogenen PFN2a in nicht-stimulierten Neuronen durch Immunfluoreszenzstudien gestützt, in denen endogenes PFN2a mit SMN assoziiert in den Zellkernen von Neuroblastoma-Zellen nachgewiesen werden konnte (Sharma et al., 2005). Zusätzlich wurde gezeigt, dass PFN2a auch in den Neuriten von PC12-Zellen mit SMN lokalisiert. Demnach wurde von Sharma et al. postuliert, dass PFN2a zusammen mit SMN als Bestandteil von „small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNP)“ exportiert wird. Hingegen wurde von Birbach et al. die Hypothese aufgestellt, dass PFN2a analog zu PFN1 im Komplex mit G-Aktin aus dem Zellkern exportiert wird (Stüven et al., 2003). Als vermeintlicher Beleg für diese Hypothese wurden PFN2a-Mutanten in Neuronen eingesetzt, für die ein Fehlen der Aktin-Bindung angenommen wurde (Birbach et al., 2006). Die in dieser Arbeit

durchgeführte biochemische Charakterisierung von PFN2a-Bindungsmutanten hat allerdings gezeigt, dass die von Birbach et al. verwendete PFN2a-Mutante PFN2a F59A G-Aktin bindet (Kapitel 3.3.9). Somit ist auch die Spezifität dieser NMDA-abhängigen Translokation von exogenem PFN2a in Frage zu stellen. Prinzipiell kann jedoch bestätigt werden, dass PFN2a in größerem Umfang als PFN1 in den Zellkernen von Neuronen präsent ist.

Folglich eröffnen sich mit dem Nachweis der konstitutiven Kernlokalisation von PFN1 und PFN2a neue Aspekte in der Untersuchung möglicher Isoform-spezifischer Funktionen. Diese könnten die Regulation der Genexpression z.B. über den Transkriptionsfaktor p42POP (Lederer et al., 2005), der Prozessierung von mRNA über SMN und p80Coilin (Giesemann et al., 1999; Skare et al., 2003; Sharma et al., 2005) und die Organisation distinkter Kernaktin-Strukturen (Gonsior et al., 1999; Schöneberger et al., 2005) umfassen.

4.2 Profilin in Gliazellen

Bisherige Studien waren auf die Funktion von PFN1 und PFN2a in Neuronen fokussiert. Im Zuge der Analyse der Kernlokalisation von endogenem PFN1 und PFN2a konnte diese Proteine überraschenderweise auch in Gliazellen nachgewiesen werden. Unter Gliazellen versteht man eine recht biochemisch und morphologisch heterogene Population von Zellen, die im ZNS von Vertebraten vielfältige Funktionen ausführen können. Während Oligodendrocyten bei ihrer Morphogenese Neuron-ähnliche Charakteristika aufweisen (Sloan & Vartanian, 2007), ähneln andere Gliazelltypen wie die Ependymzellen in ihrer Morphologie nichtneuronalen Epithelzellen.

Durch einen Zufall wurde in dieser Arbeit erstmals die Präsenz von Profilin in Gliazellen nachgewiesen. Während der Analysen zur Stimulierungs-abhängigen Profilinverteilung in Neuronen wurde eine kernständige Lokalisation von PFN2a in co-kultivierten Zellen beobachtet. Aufgrund ihrer rhomboiden Zellgestalt, die an Epithelzellen erinnert, war es offensichtlich, dass es sich bei diesen Zellen nicht um einen Neuron-Subtyp handelt. Durch die Expression des neuronalen PFN2a kann auch ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Zellen um Endothelzellen handelt. Diese exprimieren nur PFN1 (Ding et al., 2006). Aufgrund des Fehlens von GFAP, das spezifisch in Astrocyten exprimiert wird, und der epitheloiden Wuchsform wurden diese Zellen als Ependymzellen klassifiziert. Ependymzellen kleiden als Epithel die cerebralen Ventrikel des ZNS aus (DelBigio et al., 1995). Die meisten Ependymzellen besitzen apikal Cilien, durch deren Bewegung die Strömung der cerebrospinalen Flüssigkeit in den Ventrikeln erzeugt wird (Worthington & Cathcart, 1964). Eine weitere wesentliche Funktion der Ependymzellen ist die Bildung der Blut-Hirnschranke, durch die das ZNS vor potenziell schädlichen Substanzen geschützt wird (Kuchler et al., 1994). Allerdings ist nicht bekannt, inwiefern das Mikrofilamentsystem in diese Prozesse involviert ist. Bisher wurde nur die Lokalisation von Aktin und Myosin anhand erster fluoreszenzmikroskopischer Studien beschrieben (Gröschel-Stewart et al., 1977; Ishii et al., 1978).

In dieser Arbeit konnte erstmals mit PFN2a ein weiteres Aktin-assoziiertes Protein in diesen Zellen beschrieben werden. Jedoch fehlen hier noch weitergehende biochemische Analysen, um den Expressionsgrad der Profiline in diesen Zellen quantifizieren zu können.

Auffällig ist die Anreicherung von PFN2a in den Zellkernen der Ependymzellen. Diese Lokalisation von PFN2a könnte daraufhin deuten, dass diese Profilin-Isoform in den Ependymzellen in transkriptional aktiven Regionen die Genregulation beeinflusst. Hierbei könnte ein Zusammenspiel mit dem Transkriptionsfaktor p42POP erfolgen, der in hohem Maße im ZNS exprimiert und direkt durch Profilin reguliert wird (Lederer et al., 2005). Für den Nachweis einer Beteiligung von PFN2a an der Genregulation sind weitere Co-Lokalisationsstudien mit Kernkompartiment-spezifischen Markern notwendig.

Möglicherweise besteht auch eine Korrelation zwischen der Expression und Lokalisation des PFN2a und der Organisation des Aktin-Cytoskeletts in Ependym-Zellen. Die Kernlokalisierung des PFN2a war überwiegend in Ependymzellen zu beobachten, die keinen Adhäsionsgürtel aus Aktin-Filamenten ausgebildet hatten. Ependymzellen mit einem vollends ausgebildeten Adhäsionsgürtel und epitheloider Morphologie zeigten PFN2a diffus im Cytoplasma verteilt. Erschwert werden Analysen einer Differenzierungs-abhängigen Lokalisation von PFN2a durch das Fehlen geeigneter Ependym-spezifischer Markerproteine (Steiner et al., 2007).

Astrocyten stellen die häufigsten Gliazellen im ZNS dar. Ihre vielfältigen Funktionen reichen von der Aufrechterhaltung der Homöostasis in den Zellzwischenräumen, der Versorgung von Neuronen mit Nährstoffen, der Entfernung von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt bis hin zur Regulation der Synapsenentwicklung und der Modulation der Stärke reifer Synapsen (Nedergaard et al., 2003; Haydon et al., 2003; Christopherson et al., 2005). Innerhalb der letzten Jahre haben detaillierte Funktions-Analysen die Bedeutung der Astrocyten bei Synaptogenese und synaptischer Plastizität aufgezeigt. Astrocyten bilden mit Prä- und Postsynapsen tripartite, dynamische Strukturen (Ventura & Harris, 1999) Durch Reorganisation des Mikrofilamentsystems stellen Astrocyten innerhalb weniger Minuten Kontakt mit „dendritic spines“ her. Dabei können die Ausläufer der Astrocyten derart umgestaltet werden, dass diese die „dendritic spines“ umfassen. Andererseits können Astrocyten durch das Zurückziehen der Ausläufer den Kontakt zu „dendritic spines“ äußerst schnell abbrechen (Haber et al., 2006). Bisher wurde die Expression von Mikrofilament-assoziierten Proteinen wie Fascin, WAVE2 und Palladin in Astrocyten beschrieben (Hwang et al., 2008, Cestra et al., 2005; Boukelifa et al., 2006). In dieser Arbeit konnte erstmals sowohl PFN1 als auch PFN2a in kultivierten Astrocyten nachgewiesen werden, die beide gleichmäßig in den Zellen verteilt sind. Funktionsanalysen über differentielle Ausschaltung einer Isoform konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, sodass über die Beteiligung der beiden Profiline an neurogenen Prozessen wie z.B. Synaptogenese oder synaptischer Plastizität nur spekuliert werden könnte.

Neben den Astrocyten konnte in der vorliegenden Arbeit auch die Co-Expression von PFN1 und PFN2a in Oligodendrocyten nachgewiesen werden.

Diese Gliazellen sind für die saltatorische Erregungsleitung von Neuronen verantwortlich, in dem sie eine Myelin-Scheide um die Axone von Neuronen legen. Während der Morphogenese bilden die Oligodendrocyten lange Ausläufer aus, die sich spiralförmig um Axon-Segmente legen (Pedraza et al., 2001). Dabei entstehen vorübergehend sehr große Lamellipodien, die über breite Bereiche zunächst die Axone und anschließend sich selbst umhüllen. Anhand der Lamellipodien-Bildung können Gemeinsamkeiten zwischen der Oligodendrocyten-Morphogenese und der Neuritogenese der Neuronen postuliert werden (Sloan & Vartanian, 2007). Dies gilt insbesondere für die Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts an diesen Prozessen. So konnten analog zu Neuronen in den Wachstumskegeln der Oligodendrocyten die Aktin-assoziierten Proteine Cofilin und WAVE1 nachgewiesen werden (Fox et al., 2006). Letzteres spielt eine wichtige Rolle in der Oligodendrocyten-Differenzierung sowie der Myelinisierung und benötigt für seine Funktion die Interaktion mit Profilin (Kim et al., 2006; Miki et al., 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass die auf das Mikrofilamentsystem einwirkenden GTPasen Rac und Cdc42 für die Elongation und Verzweigung von Oligodendrocyten-Ausläufer essentiell sind (Liang et al., 2004).

Die Parallelität zwischen der Entwicklung von Neuronen und Oligodendrocyten scheint sich auch in der Lokalisation von PFN1 und PFN2a widerzuspiegeln. PFN1, das für die Neuritogenese von Neuroblastoma-Zellen von Bedeutung ist (Lambrechts et al., 2006), ist ubiquitär im Zellkörper und den Ausläufern der Oligodendrocyten vorhanden. Hingegen ist PFN2a, das keinen signifikanten Einfluss auf die Neuritenbildung differenzierender Neurone haben soll (Da Silva et al., 2003; Pilo-Boyl et al., 2007), hauptsächlich in Vesikel-ähnlichen Strukturen im Zellkörper der Oligodendrocyten zu finden.

Die homogene Lokalisation von PFN1 gleicht der zellulären Verteilung von endogenem WAVE1 in kultivierten Oligodendrocyten (Kim et al., 2006). Somit könnte PFN1 zusammen mit WAVE1 die Organisation des Aktin-Cytoskeletts von Oligodendrocyten regulieren. Allerdings sind die Daten zur Interaktion von WAVE1 mit den Profilin-Isoformen 1 und 2a widersprüchlich. Die bei der Erstbeschreibung von WAVE1 erhaltenden Resultate belegen eine wesentlich höhere Affinität dieses Liganden zu PFN1 (Miki et al., 1998). Hingegen wurde in einer anderen Studie die stärkere Bindung von PFN2a an WAVE1 nachgewiesen (Pilo-Boyl et al., 2007). Bei einer Kooperation von WAVE-1 und PFN2a in neuronalen Prozessen wäre zu erwarten, dass deren Knock-out zu ähnlichen Phänotypen führt. Stattdessen sind die Phänotypen von PFN2a- und WAVE1-Knock-out-Mäusen äußerst unterschiedlich. Während PFN2a-Mäuse hypernervöse Verhaltensstörungen besitzen, sind WAVE-1 Knock-out-Mäuse äußerst ruhig in ihrem Verhalten (Dahl et al., 2003; Pilo-Boyl et al., 2007). Angesichts der gravierenden Unterschiede der Phänotypen von PFN2a- und WAVE1-Knock-out-Mäusen sowie der differenziellen Lokalisation der Profilin-Isoformen in Oligodendrocyten, kann spekuliert werden, dass WAVE-1 in diesen Zellen vornehmlich mit PFN1 wechselwirkt.

Weitere Liganden, mit denen PFN1 während der Morphogenese von Oligodendrocyten wechselwirken könnte, sind N-WASP und Palladin (Boukelifa et al., 2006; Bacon et al., 2007).

Da es in dieser Arbeit nicht möglich war, in den hippocampalen Kulturen reife Oligodendrocyten nachzuweisen, sind weitere Experimente für die Analyse von PFN1 und PFN2a in Oligodendrocyten notwendig. Anhand von *in vitro* differenzierbaren Vorläuferzellen könnte die Morphogenese-abhängige Lokalisation von PFN1 und PFN2a in Oligodendrocyten verfolgt werden (Vartanian et al., 1997).

4.3 Funktionen von Profilin 2a in Aktin-abhängigen Prozessen nicht-neuronaler Zellen

Die Immunfluoreszenz-Studien und morphologischen Analysen dieser Arbeit deuten auf spezifische Funktionen von PFN2a in synaptischen Strukturen hin. Allerdings kann durch diese Resultate nicht belegt werden, ob PFN2a das in Mammalia ubiquitäre PFN1 in nicht-neuronalen Zellen substituieren kann. Erstaunlicherweise konnte im Huhn eine Beteiligung des endogenen PFN2a (chPFN2a) an Aktin-abhängigen Prozessen nicht-neuronaler Zellen gezeigt werden.

Die Sequenzvergleiche verschiedener Profiline kamen zu dem unerwarteten Resultat, dass das als neuronale Isoform klassifizierte PFN2a in weit höherem Maße innerhalb der Vertebraten konserviert ist als PFN1 (Polet et al., 2007). Auf der Grundlage von Datenbankanalysen bestand nicht zwingend der Anlass, in anderen Organismen als Mensch und Maus einen Unterschied in der zellulären Funktion von PFN2a zu vermuten. Jedoch wiesen Western Blot-Analysen von Extrakten aus Hühnerfibroblasten mit Isoform-spezifischen Antikörpern die Expression eines mPFN2a-Homologs (chPFN2a) in nicht-neuronalen Zellen nach. Zunächst wurde angenommen, dass chPFN2a analog zu PFN1 in nicht-neuronalen Mammalia-Zellen als einzige Profilin-Isoform in Hühnerfibroblasten exprimiert wird (Janke et al., 2000; Wittenmayer et al., 2004; Ding et al., 2006; Zou et al., 2007). In diesem Fall hätte ohne weiteres postuliert werden können, dass chPFN2a in Hühnerfibroblasten die Funktionen von PFN1 in Mammalia wie die Modulation der Morphogenese, der Zelladhäsion und der Zellmotilität übernimmt (Jockusch et al., 2007). Mit dem Nachweis der Co-Expression von chPFN1 und chPFN2a in Hühnerfibroblasten stellte sich wiederum die Frage, ob sich diese Isoformen auch in nicht-neuronalen Zellen des Huhns funktionell redundant oder unterschiedlich zueinander verhalten.

Eine Kombination aus Expressions-, Immunfluoreszenz- und RNAi-Analysen konnte zeigen, dass tatsächlich PFN2a im Huhn maßgeblich Aktin-abhängige Prozessen reguliert.

Einerseits ähnelt die ubiquitäre Expression des chPFN2a dem aus Mäusen bekannten Expressionsmuster von PFN1 (Witke et al., 1998; 2001). Andererseits wird die generelle Funktion von PFN2a in der Aktin-Dynamik dadurch nachvollziehbar, dass die Expression von chPFN1 in einigen adulten Organen nicht nachweisbar ist.

Zudem zeigte die Analyse der Lokalisation beider Profilin-Isoformen in isolierten Hühnerfibroblasten, dass chPFN1 in kürzlich isolierten Fibroblasten sich überwiegend in den Zellkernen befindet. Bisher konnte in einigen Mammalia-Zellen eine Akkumulation von PFN1 im Zellkern von Mammalia-Zellen nachgewiesen werden (Mayboroda et al., 1997; Giesemann et al., 1999; Skare et al., 2003; Rawe et al.,

2006). Im Gegensatz zu chPFN1 in Hühnerfibroblasten waren jedoch in allen untersuchten Zelltypen außerdem hohe Mengen an PFN1 im Cytoplasma vorhanden. Da PFN2a nicht nur im Zellkern, sondern analog zu Ratten-PFN1 mit Mikrofilamenten assoziiert im Cytoplasma lokalisiert (Buss et al., 1992), wurde eine überwiegende PFN2a-abhängige Regulation der cytoplasmatischen Aktin-Dynamik postuliert.

Zwar konnte während der Kultivierung sowohl eine Konzentrationszunahme als auch eine Translokation von chPFN1 in das Cytoplasma beobachtet werden. Funktionelle Analysen mit einem geeigneten RNAi-System haben jedoch gezeigt, dass chPFN1 nur einen geringen Einfluss auf Aktin-abhängige Prozesse im Cytoplasma von Hühnerfibroblasten hat. Hingegen wird PFN2a analog zu humanem PFN1 in Endothelzellen für die Zelladhäsion und die Zellmigration benötigt wird (Ding et al., 2006). Aufgrund dieser Resultate stellt sich die Frage, weshalb PFN1 in kultivierten Hühnerfibroblasten den Verlust von PFN2a trotz einer zweifach höheren Proteinmenge und einer cytoplasmatischen Lokalisation nicht kompensieren kann.

Möglicherweise ist dies auf die biochemischen Eigenschaften von chPFN1 zurückzuführen. Ein Sequenzvergleich von PFN1-Isoformen aus verschiedenen Organismen zeigt, dass in dem chPFN1-Molekül an der Position 59 anstelle eines Phenylalanins ein Leucin vorhanden ist (Abb.4.4).

<i>Danio</i> PFN1	DVLVGKDRQS F FTNGLTLGSKKCSVIR D NLTTEGDWTMD I RTKSQGGEP T YNIAGVKATK T LMVMKGKEGI H GG
<i>Xenopus</i> PFN1	NAVVSQDREK L FVNGLVLGGQKCSVL R DEFSVADNQVMD L RTKNP G -PTYNISICKTAKALVLVMGNAEV H GG
<i>Gallus</i> PFN1	NALVSPERG A LVNGLTLGGQKCSVIR D SLLVDGEHTMD L RTKSSAGAPT Y NIATITNK T IVLVMGKEGV H GG
<i>Mus</i> PFN1	GVLVGKDR S S F FNGLTLGGQKCSVIR D SLLQDGEFTMD L RTKSTGGAPT F NVTVTMTAK T LVLVMGKEGV H GG

Abb. 4.4: Sequenzvergleich der Aktin-Bindungsregion von Profilin 1-Isoformen aus verschiedenen Organismen

Die Aminosäure-Sequenzen der PFN1-Aktin-Bindungsregionen (49-121) verschiedener Organismen wurden durch Datenbankanalysen recherchiert und verglichen. Zwischen den verschiedenen PFN1-Isoformen vollständig konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Für die Aktin-Bindung entscheidende Aminosäuren sind gelb unterlegt. Die Substitutionen an Position 59 in PFN1 aus Huhn und *Xenopus* sind rot hervorgehoben. Im Gegensatz zu PFN1 aus *Danio rerio* und *Mus musculus* ist die Aminosäure 59 in PFN1 aus *Xenopus tropicalis* und *Gallus gallus* substituiert (rot markiert).

Eine Mutation dieser Aminosäure bewirkt eine 14fache Verringerung der G-Aktin-Bindung von Rinder-Profilin 1 (Schlüter et al., 1998). Folglich bindet chPFN1 wohl mit geringerer Affinität G-Aktin und kann daher den Verlust von PFN2a in Aktin-abhängigen Prozessen nicht kompensieren.

Falls die Aktin-Bindung des chPFN1 aufgrund der Co-Expression mit PFN2a nur eine sekundäre Bedeutung hat, stellt sich die Frage nach dessen hauptsächlichen Funktion. Die Kernlokalisation des chPFN1 könnte ein Hinweis auf die Beteiligung an Genregulations- und Spleißprozessen sein, da in Mammalia PFN1 über die Poly-Prolin-Bindungsdomäne mit p42POP, SMN und p80Coilin interagiert (Giesemann et al., 1999; Skare et al., 2003; Lederer et al., 2005).

Anhand kürzlich erfolgter Analysen des Transkriptionsfaktors p42POP in C2C12-Zellen kann eine Korrelation zwischen der chPFN1-Translokation und der p42POP-abhängigen Genregulation vermutet werden. Profilin hemmt die Dimerisierung von p42POP und somit dessen modulierende Wirkung auf die Transkription (Lederer et al., 2005). RNAi-Experimente haben in C2C12-Zellen gezeigt, dass p42POP die Proliferation begünstigt und entsprechend die *in vitro*-Differenzierung dieser Zellen hemmt (persönliche Mitteilung, Maren Siemon (TU Braunschweig)). Durch die Kultivierung in Serum-reichem Medium werden die primären Hühnerfibroblasten zur Proliferation angeregt. Somit ist es denkbar, dass durch Serum-abhängige Signalkaskaden die Translokation des chPFN1 in das Cytoplasma ausgelöst wird, um eine Aktivierung von p42POP zu ermöglichen. Diese Hypothese einer Proliferation-abhängigen Funktion von chPFN1 wird durch die Expressionsmuster der Profiline gestützt. In der Gewebekonstruktion proliferieren die Zellen vermehrt, während gerade in Organen des adulten Organismus wie dem Gehirn und den Muskeln sich wenig proliferierende Zellen befinden. Da PFN2a ebenfalls im Zellkern von Hühnerfibroblasten vorhanden ist, müssten allerdings auch in diesem Kompartiment beide Profilin-Isoformen unterschiedliche Funktionen besitzen.

Der Nachweis, dass chPFN2a die cytoplasmatischen Funktionen der PFN1-Isoformen der Mammalia übernimmt, eröffnet neue Perspektiven bezüglich der Evolution der Profiline in Vertebraten. Aufgrund der höheren Konservierung von PFN2a innerhalb der Vertebraten könnte spekuliert werden, dass diese Isoform evolutiv älter ist als PFN1. Da bisher die Expressionsmuster der Profiline in anderen Vertebraten noch nicht bestimmt wurden, könnte PFN2a ebenfalls in anderen Spezies die ubiquitär exprimierte Isoform darstellen. Die Gemeinsamkeiten zwischen PFN1-Isoformen aus Zebrafisch und Maus bzw. PFN2a in Krallenfrosch und Huhn deuten daraufhin, dass innerhalb der Amphibien in manchen Organismen PFN1 seine hohe Affinität zu G-Aktin verlor (Abb. 4.4). Möglicherweise hat PFN2a in diesen Organismen zusätzliche Funktionen in der Aktin-Dynamik von nicht-neuronalen Zellen hinzugewonnen oder beibehalten. Vielleicht markieren PFN1 und PFN2a einen Zeitpunkt, an dem sich die Entwicklungen zu Sauropsiden und Mammalia voneinander trennten.

In Mammalia könnte die Expression von PFN2a aufgrund des ubiquitären PFN1 auf neuronale Zellen beschränkt worden sein, da PFN2a im Gegensatz zu PFN1 neurospezifische Prozesse wie z.B. die strukturelle Plastizität von Synapsen regulieren kann.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen auf verschiedenen Gebieten neue Ansätze zur Erforschung der Profiline. Dies betrifft die Funktionen der Profiline im ZNS, die molekularen Mechanismen zur Regulation der Profiline sowie die Evolution der verschiedenen Profilin-Isoformen.

4.4.1 Ausblick zur Analyse von Profilin 1 und Profilin 2a in Neuronen

Die mithilfe des „Knock down & Knock in“-Vektorsystems erzielten Resultate haben erstmals eine Funktion von PFN2a in der Aktin-abhängigen Regulation der dendritischen Morphologie nachgewiesen. Bisher ist jedoch unbeantwortet, welche Funktion PFN1 in diesen Prozesse spielen könnte. Da PFN1 im Gegensatz zu PFN2a weit weniger in „dendritic spines“ lokalisiert, liegt die Vermutung nahe, dass die morphologischen Veränderungen der CA1-Neurone PFN2a-spezifisch sind. Mit Sicherheit kann dies durch PFN1-spezifische RNAi-Experimente verifiziert werden. Da die Transfektion von Neuronen mit einem PFN1-spezifischen RNAi-Plasmid zu einer drastisch erhöhten Letalität führte, konnte eine mögliche Funktion von PFN1 in Dendriten und „dendritic spines“ nicht analysiert werden. Alternativ könnte jedoch über das PFN2a-spezifische „Knock down & Knock in“-System endogenes PFN2a gegen PFN1 substituiert werden. Anhand analoger morphologischer Studien in Neuronen mit erhöhter PFN1-Expression könnte festgestellt werden, ob die Regulation der dendritischen Morphologie Isoform-spezifisch auf dem Verlust von PFN2a basiert. Zudem gilt es die Signalkaskaden zu identifizieren, die PFN2a und seine Auswirkungen auf das Mikrofilamentsystem von Neuronen steuern.

Zur Untersuchung von Signalkaskaden und ihrer Effektoren könnten weitere Bindungsmutanten von PFN2a verwendet werden. Phospholipid-Bindungsmutanten von PFN2a könnten zum Nachweis PLC γ 1-abhängiger Signalwege genutzt werden. Für die Untersuchung einer Phosphorylierungs-abhängigen Regulation von PFN2a könnten nach Kartierung der Phosphorylierungsstellen die entsprechenden Aminosäure-Reste mutiert werden. Einerseits könnten Phosphorylierungsmutanten *in vivo* eingesetzt werden, die keine Phosphorylierung zu lassen. Zum anderen könnten PFN2a-Mutanten verwendet werden, die durch Aminosäure-Substitutionen eine konstitutive Phosphorylierung simulieren. Sowohl Phospholipid- als auch Phosphorylierungsmutanten könnten vor allem mit dem vorgestellten „Knock down & Knock in“-System detailliert untersucht werden. Zusätzlich zum Einsatz des „Knock down & Knock in“-Systems könnten konstitutiv-aktive Rezeptoren in Neuronen verwendet werden. Dies könnte zu einer stärkeren Ausprägung der Prozesse führen, die Profilin-abhängig in Neuronen reguliert werden. Zusätzlich könnten Kinase-Inhibitoren Aufschluss über die Signalwege bieten, in die PFN2a involviert ist.

4.4.2 Ausblick zur Erforschung von Profilin 1 und 2a in Gliazellen

Der erstmalige Nachweis der Profilin-Isoformen 1 und 2a in Gliazellen lässt vermuten, dass beide Isoformen neuronale Funktionen im ZNS ausüben. Durch die Verwendung eines modifizierten „Knock down & Knock in“-Systems, das auf Gliazelltyp-spezifischen Promotoren basiert, könnte speziell der Einfluss von Profilin auf die Myelinisierung und die Astrocyten-abhängigen Prozesse bei der Synaptogenese und synaptischen Plastizität untersucht werden.

Falls PFN1 und/oder PFN2a auch in Gliomen exprimiert werden und dort Profilin wie in Brustkrebszellen eine Tumorsuppressoraktivität hat (Janke et al., 2000, Wittenmayer et al., 2004, Zou et al., 2007), könnte über das „Knock down & Knock in“-System die Profilin-abhängige Migration, Invasivität und Metastasenbildung von Glioma in Zellkultur-Experimenten untersucht werden.

4.4.3 Ausblick zur Untersuchung von Profilin 1 und 2a in anderen Organismen

Die ubiquitäre Expression von PFN2a in den verschiedenen getesteten Organen des Huhns kann ein Hinweis darauf sein, dass das in Mäusen vorherrschende Profilin-Expressionsmuster ein Sonderfall ist. Möglicherweise übernimmt PFN2a auch in anderen Vertebraten außerhalb der Vögel neben seinen ZNS-spezifischen Funktionen in nicht-neuronalen Zellen Funktionen, die in Mammalia von PFN1 erfüllt werden. Zum Beleg dieser Hypothese müssen natürlich weit mehr Organismen der Vertebraten als in dieser Arbeit untersucht werden. Von besonderem Interesse könnten die Expressionsmuster der Profiline in Vertebraten sein, die evolutiv betrachtet Vorläufer der Mammalia und Sauropsiden darstellen. Unter den verfügbaren Modellorganismen wären dies der Zebrafisch *Danio rerio*, der Kugelfisch *Fugu rubripes*, der Axolotl *Ambystoma mexicanum* und der Krallenfrosch *Xenopus tropicalis*.

Zudem sind weitere funktionelle Analysen der Profiline im Huhn vorstellbar. Eine biochemische Charakterisierung von chPFN1 könnte einen weiteren Beleg liefern, dass PFN2a in diesem Organismus die maßgebliche Funktion in der Regulation der Aktin-Dynamik besitzt. Zudem sind inzwischen die Mittel verfügbar, den Einfluss von Profilin auf die Embryogenese des Huhns zu untersuchen. So könnten durch eine *in ovo*-Elektroporation Hühner-Embryonen mit den in dieser Arbeit konstruierten miRNA-Vektoren transfiziert werden (Baeriswyl et al., 2008). Durch diese Methode könnte über Zellkulturexperimente hinaus die Funktion der Profiline direkt im Organismus verfolgt werden. Für weiterführende Experimente könnte das „Knock down & Knock in“-System derart modifiziert werden, dass es im Huhn einsetzbar ist. Mit einer gegenseitigen Substitution der Profilin-Isoformen könnte deren funktionelle Diversität weiterführend analysiert werden.

4.4.4 Mögliche Modifikationen des „Knock down & Knock in“-Vektorsystems

Die bisher erwähnten Experimente für eine weiterführende Analyse der Profiline basieren auf der Weiterentwicklung des „Knock down & Knock in“-Vektorsystems. Für biochemische Analysen wie die exakte Bestimmung der Expression von endogenem und exogenem Profilin ist eine drastische Erhöhung des Anteils transfizierter Zellen notwendig.

Dies könnte auf der Basis von amphotropen Lentiviren erfolgen, mit denen neuronale Zellen mit einer Effizienz von über 90 Prozent infiziert werden können (Janas et al., 2006; Harper et al., 2008).

Zur Vermeidung cytotoxischer Effekte in den Verpackungszelllinien ist es wahrscheinlich nötig, die Promotoren eines lentiviralen „Knock down & Knock in“-Systems zu modifizieren. Denkbar sind ZNS-spezifische Promotoren, die während der Produktion der Viren in HEK293T-Zellen nicht aktiv sind. Alternativ zu zelltypspezifischen RNAi-Plasmiden könnte auch ein konditionales „Knock down & Knock in“-Vektorsystem auf der Basis von Tetracyclin-induzierbaren Promotoren entwickelt werden. Bisher wurden solche Systeme für den RNAi-vermittelten Knock down (Dickins et al., 2007; Gray et al., 2007; Henriksen et al., 2007) und die Expression von Genen (Gossen et al., 1992, 1995; Kistner et al., 1996) getrennt voneinander eingesetzt. Mit einem konditionalen „Knock down & Knock in“-System könnten die Funktionen verschiedener Isoformen und Mutanten von Genen nicht nur in kultivierten Zellen, sondern auch in Organismen analysiert werden

5 Literaturverzeichnis

- Ackermann, M. and Matus, A. (2003) Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci*, **6**, 1194-1200.
- Ahmad, F.J., Hughey, J., Wittmann, T., Hyman, A., Greaser, M. and Baas, P.W. (2000) Motor proteins regulate force interactions between microtubules and microfilaments in the axon. *Nat Cell Biol*, **2**, 276-280.
- Allison, D.W., Chervin, A.S., Gelfand, V.I. and Craig, A.M. (2000) Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *J Neurosci*, **20**, 4545-4554.
- Arasada, R., Gloss, A., Tunggal, B., Joseph, J.M., Rieger, D., Mondal, S., Faix, J., Schleicher, M. and Noegel, A.A. (2007) Profilin isoforms in Dictyostelium discoideum. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 631-641.
- Armstrong, D., Dunn, J.K., Antalffy, B. and Trivedi, R. (1995) Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*, **54**, 195-201.
- Bacon, C., Lakics, V., Machesky, L. and Rumsby, M. (2007) N-WASP regulates extension of filopodia and processes by oligodendrocyte progenitors, oligodendrocytes, and Schwann cells-implications for axon ensheathment at myelination. *Glia*, **55**, 844-858.
- Baeriswyl, T., Mauti, O. and Stoeckli, E.T. (2008) Temporal control of gene silencing by in ovo electroporation. *Methods Mol Biol*, **442**, 231-244.
- Balschun, D., Wolfer, D.P., Gass, P., Mantamadiotis, T., Welzl, H., Schutz, G., Frey, J.U. and Lipp, H.P. (2003) Does cAMP response element-binding protein have a pivotal role in hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory? *J Neurosci*, **23**, 6304-6314.
- Barzik, M., Kotova, T.I., Higgs, H.N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F.B. and Schafer, D.A. (2005) Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem*, **280**, 28653-28662.
- Bausen, M., Fuhrmann, J.C., Betz, H. and O'Sullivan G, A. (2006) The state of the actin cytoskeleton determines its association with gephyrin: role of ena/VASP family members. *Mol Cell Neurosci*, **31**, 376-386.
- Becherer, U. and Rettig, J. (2006) Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res*, **326**, 393-407.
- Becskei, A. and Mattaj, I.W. (2005) Quantitative models of nuclear transport. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 27-34.
- Bibel, M. and Barde, Y.A. (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, **14**, 2919-2937.
- Biou, V., Brinkhaus, H., Malenka, R.C. and Matus, A. (2008) Interactions between drebrin and Ras regulate dendritic spine plasticity. *Eur J Neurosci*, **27**, 2847-2859.
- Birbach, A., Verkuyl, J.M. and Matus, A. (2006) Reversible, activity-dependent targeting of profilin to neuronal nuclei. *Exp Cell Res*, **312**, 2279-2287.

- Bjorkegren-Sjogren, C., Korenbaum, E., Nordberg, P., Lindberg, U. and Karlsson, R. (1997) Isolation and characterization of two mutants of human profilin I that do not bind poly(L-proline). *FEBS Lett*, **418**, 258-264.
- Blasco, R., Cole, N.B. and Moss, B. (1991) Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene encoding a homolog of profilin, a eukaryotic actin-binding protein. *J Virol*, **65**, 4598-4608.
- Blendy, J.A., Kaestner, K.H., Schmid, W., Gass, P. and Schutz, G. (1996) Targeting of the CREB gene leads to up-regulation of a novel CREB mRNA isoform. *Embo J*, **15**, 1098-1106.
- Bloch, A. and Bloch, R. (2007) A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem*, **102**, 289-305.
- Boden, D., Pusch, O., Silbermann, R., Lee, F., Tucker, L. and Ramratnam, B. (2004) Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1154-1158.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B. and Schaffner, W. (1985) A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, **41**, 521-530.
- Boukhelifa, M., Moza, M., Johansson, T., Rachlin, A., Parast, M., Huttelmaier, S., Roy, P., Jockusch, B.M., Carpen, O., Karlsson, R. and Otey, C.A. (2006) The proline-rich protein palladin is a binding partner for profilin. *Febs J*, **273**, 26-33.
- Bourne, J. and Harris, K.M. (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol*, **17**, 381-386.
- Bradatsch, B. (2001): Biochemische Charakterisierung und subzelluläre Lokalisation von Poly-L-Prolin-Mutanten des Proteins Profilin. Diplomarbeit, TU Braunschweig.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Braun, A., Aszodi, A., Hellebrand, H., Berna, A., Fassler, R. and Brandau, O. (2002) Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. *Gene*, **283**, 219-225.
- Bubb, M.R., Yarmola, E.G., Gibson, B.G. and Southwick, F.S. (2003) Depolymerization of actin filaments by profilin. Effects of profilin on capping protein function. *J Biol Chem*, **278**, 24629-24635.
- Burnett, B.G., Andrews, J., Ranganathan, S., Fischbeck, K.H. and Di Prospero, N.A. (2008) Expression of expanded polyglutamine targets profilin for degradation and alters actin dynamics. *Neurobiol Dis*, **30**, 365-374.
- Buss, F., Temm-Grove, C., Henning, S. and Jockusch, B.M. (1992) Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments. *Cell Motil Cytoskeleton*, **22**, 51-61.
- Butler-Cole, C., Wagner, M.J., Da Silva, M., Brown, G.D., Burke, R.D. and Upton, C. (2007) An ectromelia virus profilin homolog interacts with cellular tropomyosin and viral A-type inclusion protein. *Virol J*, **4**, 76.
- Canossa, M., Gartner, A., Campana, G., Inagaki, N. and Thoenen, H. (2001) Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI) and Trk receptor activation is mediated via phospholipase C signalling pathways. *Embo J*, **20**, 1640-1650.

- Carlsson, L., Nystrom, L.E., Sundkvist, I., Markey, F. and Lindberg, U. (1977) Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol*, **115**, 465-483.
- Cestra, G., Toomre, D., Chang, S. and De Camilli, P. (2005) The Abl/Arg substrate ArgBP2/nArgBP2 coordinates the function of multiple regulatory mechanisms converging on the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1731-1736.
- Charrier, C., Ehrensperger, M.V., Dahan, M., Levi, S. and Triller, A. (2006) Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane. *J Neurosci*, **26**, 8502-8511.
- Chaudhary, A., Chen, J., Gu, Q.M., Witke, W., Kwiatkowski, D.J. and Prestwich, G.D. (1998) Probing the phosphoinositide 4,5-bisphosphate binding site of human profilin I. *Chem Biol*, **5**, 273-281.
- Chaudhry, F.A., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Danbolt, N.C., Osen, K.K., Edwards, R.H. and Storm-Mathisen, J. (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci*, **18**, 9733-9750.
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C., Mallowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P. and Barres, B.A. (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, **120**, 421-433.
- Cingolani, L.A. and Goda, Y. (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 344-356.
- Cooley, L., Verheyen, E. and Ayers, K. (1992) chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis. *Cell*, **69**, 173-184.
- Cooper, J.A., Buhle, E.L., Jr., Walker, S.B., Tsong, T.Y. and Pollard, T.D. (1983) Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization. *Biochemistry*, **22**, 2193-2202.
- Da Silva, J.S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W. and Dotti, C.G. (2003) RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J Cell Biol*, **162**, 1267-1279.
- Dahl, J.P., Wang-Dunlop, J., Gonzales, C., Goad, M.E., Mark, R.J. and Kwak, S.P. (2003) Characterization of the WAVE1 knock-out mouse: implications for CNS development. *J Neurosci*, **23**, 3343-3352.
- Darcy, K.J., Staras, K., Collinson, L.M. and Goda, Y. (2006) Constitutive sharing of recycling synaptic vesicles between presynaptic boutons. *Nat Neurosci*, **9**, 315-321.
- Del Bigio, M.R. (1995) The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*, **14**, 1-13.
- Dent, E.W. and Gertler, F.B. (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, **40**, 209-227.
- Di Nardo, A., Gareus, R., Kwiatkowski, D. and Witke, W. (2000) Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *J Cell Sci*, **113 Pt 21**, 3795-3803.
- Dickins, R.A., Hemann, M.T., Zilfou, J.T., Simpson, D.R., Ibarra, I., Hannon, G.J. and Lowe, S.W. (2005) Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nat Genet*, **37**, 1289-1295.

- Dickins, R.A., McJunkin, K., Hernando, E., Premisrirut, P.K., Krizhanovsky, V., Burgess, D.J., Kim, S.Y., Cordon-Cardo, C., Zender, L., Hannon, G.J. and Lowe, S.W. (2007) Tissue-specific and reversible RNA interference in transgenic mice. *Nat Genet*, **39**, 914-921.
- Ding, Z., Lambrechts, A., Parepally, M. and Roy, P. (2006) Silencing profilin-1 inhibits endothelial cell proliferation, migration and cord morphogenesis. *J Cell Sci*, **119**, 4127-4137.
- Domke, T., Federau, T., Schluter, K., Giehl, K., Valenta, R., Schomburg, D. and Jockusch, B.M. (1997) Birch pollen profilin: structural organization and interaction with poly-(L-proline) peptides as revealed by NMR. *FEBS Lett*, **411**, 291-295.
- Domitrovich, A.M. and Kunkel, G.R. (2003) Multiple, dispersed human U6 small nuclear RNA genes with varied transcriptional efficiencies. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2344-2352.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A. and Banker, G.A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, **8**, 1454-1468.
- Dresbach, T., Hempelmann, A., Spilker, C., tom Dieck, S., Altmann, W.D., Zuschratter, W., Garner, C.C. and Gundelfinger, E.D. (2003) Functional regions of the presynaptic cytomatrix protein bassoon: significance for synaptic targeting and cytomatrix anchoring. *Mol Cell Neurosci*, **23**, 279-291.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Fan, J. and Raper, J.A. (1995) Localized collapsing cues can steer growth cones without inducing their full collapse. *Neuron*, **14**, 263-274.
- Fedorov, A.A., Ball, T., Valenta, R. and Almo, S.C. (1997) X-ray crystal structures of birch pollen profilin and Phl p 2. *Int Arch Allergy Immunol*, **113**, 109-113.
- Fedorov, A.A., Magnus, K.A., Graupe, M.H., Lattman, E.E., Pollard, T.D. and Almo, S.C. (1994) X-ray structures of isoforms of the actin-binding protein profilin that differ in their affinity for phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8636-8640.
- Ferron, F., Rebowski, G., Lee, S.H. and Dominguez, R. (2007) Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *Embo J*, **26**, 4597-4606.
- Filipowicz, W. (2005) RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*, **122**, 17-20.
- Finkel, T., Theriot, J.A., Diser, K.R., Tomaselli, G.F. and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1994) Dynamic actin structures stabilized by profilin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1510-1514.
- Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D. and Matus, A. (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, **20**, 847-854.
- Fischer, M., Kaech, S., Wagner, U., Brinkhaus, H. and Matus, A. (2000) Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat Neurosci*, **3**, 887-894.
- Fox, M.A., Afshari, F.S., Alexander, J.K., Colello, R.J. and Fuss, B. (2006) Growth conelike sensorimotor structures are characteristic features of postmigratory, premyelinating oligodendrocytes. *Glia*, **53**, 563-566.
- Fritschy, J.M., Harvey, R.J. and Schwarz, G. (2008) Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends Neurosci*, **31**, 257-264.
- Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T. and Ishiwata, S. (2002) Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat Cell Biol*, **4**, 666-673.

- Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K. and Inokuchi, K. (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*, **38**, 447-460.
- Gabrion, J.B., Herbute, S., Bouille, C., Maurel, D., Kuchler-Bopp, S., Laabich, A. and Delaunoy, J.P. (1998) Ependymal and choroidal cells in culture: characterization and functional differentiation. *Microsc Res Tech*, **41**, 124-157.
- Gallo, G., Yee, H.F., Jr. and Letourneau, P.C. (2002) Actin turnover is required to prevent axon retraction driven by endogenous actomyosin contractility. *J Cell Biol*, **158**, 1219-1228.
- Gareus, R., Di Nardo, A., Rybin, V. and Witke, W. (2006) Mouse profilin 2 regulates endocytosis and competes with SH3 ligand binding to dynamin 1. *J Biol Chem*, **281**, 2803-2811.
- Gartner, A., Polnau, D.G., Staiger, V., Sciarretta, C., Minichiello, L., Thoenen, H., Bonhoeffer, T. and Korte, M. (2006) Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling. *J Neurosci*, **26**, 3496-3504.
- Geese, M., Schluter, K., Rothkegel, M., Jockusch, B.M., Wehland, J. and Sechi, A.S. (2000) Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci*, **113** (Pt 8), 1415-1426.
- Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J. and Soriano, P. (1996) Mena, a relative of VASP and *Drosophila Enabled*, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*, **87**, 227-239.
- Giehl, K., Valenta, R., Rothkegel, M., Ronsiek, M., Mannherz, H.G. and Jockusch, B.M. (1994) Interaction of plant profilin with mammalian actin. *Eur J Biochem*, **226**, 681-689.
- Giesemann, T., Rathke-Hartlieb, S., Rothkegel, M., Bartsch, J.W., Buchmeier, S., Jockusch, B.M. and Jockusch, H. (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem*, **274**, 37908-37914.
- Giesemann, T., Schwarz, G., Nawrotzki, R., Berhorster, K., Rothkegel, M., Schluter, K., Schrader, N., Schindelin, H., Mendel, R.R., Kirsch, J. and Jockusch, B.M. (2003) Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J Neurosci*, **23**, 8330-8339.
- Gilmore, I.R., Fox, S.P., Hollins, A.J. and Akhtar, S. (2006) Delivery strategies for siRNA-mediated gene silencing. *Curr Drug Deliv*, **3**, 147-145.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Furman, M.I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V.T. and Pollard, T.D. (1992) The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell*, **3**, 1015-1024.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Kim, J.W., Machesky, L.M., Rhee, S.G. and Pollard, T.D. (1991) Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science*, **251**, 1231-1233.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Machesky, L.M., Baldassare, J.J. and Pollard, T.D. (1990) The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science*, **247**, 1575-1578.
- Gonsior, S.M., Platz, S., Buchmeier, S., Scheer, U., Jockusch, B.M. and Hinssen, H. (1999) Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci*, **112** (Pt 6), 797-809.

- Gonzalez, L.C., Jr., Weis, W.I. and Scheller, R.H. (2001) A novel snare N-terminal domain revealed by the crystal structure of Sec22b. *J Biol Chem*, **276**, 24203-24211.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. and Bujard, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766-1769.
- Gray, D.C., Hoeflich, K.P., Peng, L., Gu, Z., Gogineni, A., Murray, L.J., Eby, M., Kljavin, N., Seshagiri, S., Cole, M.J. and Davis, D.P. (2007) pHUSH: a single vector system for conditional gene expression. *BMC Biotechnol*, **7**, 61.
- Greengard, P., Benfenati, F. and Valtorta, F. (1994) Synapsin I, an actin-binding protein regulating synaptic vesicle traffic in the nerve terminal. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **29**, 31-45.
- Grenklo, S., Geese, M., Lindberg, U., Wehland, J., Karlsson, R. and Sechi, A.S. (2003) A crucial role for profilin-actin in the intracellular motility of *Listeria monocytogenes*. *EMBO Rep*, **4**, 523-529.
- Groschel-Stewart, U., Unsicker, K. and Leonhardt, H. (1977) Immunohistochemical demonstration of contractile proteins in astrocytes, marginal glial and ependymal cells in rat diencephalon. *Cell Tissue Res*, **180**, 133-137.
- Guljamow, A., Jenke-Kodama, H., Saumweber, H., Quillardet, P., Frangeul, L., Castets, A.M., Bouchier, C., Tandeau de Marsac, N. and Dittmann, E. (2007) Horizontal gene transfer of two cytoskeletal elements from a eukaryote to a cyanobacterium. *Curr Biol*, **17**, R757-759.
- Haarer, B.K., Lillie, S.H., Adams, A.E., Magdolen, V., Bandlow, W. and Brown, S.S. (1990) Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J Cell Biol*, **110**, 105-114.
- Haber, M., Zhou, L. and Murai, K.K. (2006) Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci*, **26**, 8881-8891.
- Halpain, S. (2003) Actin in a supporting role. *Nat Neurosci*, **6**, 101-102.
- Halpain, S., Hipolito, A. and Saffer, L. (1998) Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. *J Neurosci*, **18**, 9835-9844.
- Hanus, C., Ehrensperger, M.V. and Triller, A. (2006) Activity-dependent movements of postsynaptic scaffolds at inhibitory synapses. *J Neurosci*, **26**, 4586-4595.
- Harbeck, B., Huttelmaier, S., Schluter, K., Jockusch, B.M. and Illenberger, S. (2000) Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem*, **275**, 30817-30825.
- Harper, S.Q. and Gonzalez-Alegre, P. (2008) Lentivirus-mediated RNA interference in mammalian neurons. *Methods Mol Biol*, **442**, 95-112.
- Harrington, A.W., Leiner, B., Blechschmitt, C., Arevalo, J.C., Lee, R., Morl, K., Meyer, M., Hempstead, B.L., Yoon, S.O. and Giehl, K.M. (2004) Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6226-6230.
- Haugwitz, M., Noegel, A.A., Karakesisoglou, J. and Schleicher, M. (1994) Dictyostelium amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell*, **79**, 303-314.
- Hayashi, K., Ishikawa, R., Kawai-Hirai, R., Takagi, T., Taketomi, A. and Shirao, T. (1999) Domain analysis of the actin-binding and actin-remodeling activities of drebrin. *Exp Cell Res*, **253**, 673-680.

- Hayashi, K. and Shirao, T. (1999) Change in the shape of dendritic spines caused by overexpression of drebrin in cultured cortical neurons. *J Neurosci*, **19**, 3918-3925.
- Haydon, P.G. (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 185-193.
- Henriksen, J.R., Lokke, C., Hammero, M., Geerts, D., Versteeg, R., Flaegstad, T. and Einvik, C. (2007) Comparison of RNAi efficiency mediated by tetracycline-responsive H1 and U6 promoter variants in mammalian cell lines. *Nucleic Acids Res*, **35**, e67.
- Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Knott, G.W., Welker, E. and Svoboda, K. (2006) Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature*, **441**, 979-983.
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G.C. and Kasai, H. (2008) The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, **57**, 719-729.
- Honore, B., Madsen, P., Andersen, A.H. and Leffers, H. (1993) Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett*, **330**, 151-155.
- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T. and Zhu, Y. (2001) Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes. *Exp Nephrol*, **9**, 265-274.
- Huang, E.J. and Reichardt, L.F. (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **72**, 609-642.
- Huang, S., McDowell, J.M., Weise, M.J. and Meagher, R.B. (1996) The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant Physiol*, **111**, 115-126.
- Huang, T.Y., DerMardirossian, C. and Bokoch, G.M. (2006) Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 26-31.
- Huang, Y.H. and Bergles, D.E. (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol*, **14**, 346-352.
- Hummler, E., Cole, T.J., Blendy, J.A., Ganss, R., Aguzzi, A., Schmid, W., Beermann, F. and Schutz, G. (1994) Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5647-5651.
- Hunecke, D (2006). Protein “knock down” der Profilin-Isoformen 1 und 2a in verschiedenen Zellsystemen: Konstruktion von miRNA-Vektoren und Funktionsanalyse. Diplomarbeit, TU Braunschweig.
- Hwang, J.H., Smith, C.A., Salhia, B. and Rutka, J.T. (2008) The role of fascin in the migration and invasiveness of malignant glioma cells. *Neoplasia*, **10**, 149-159.
- Iki, J., Inoue, A., Bito, H. and Okabe, S. (2005) Bi-directional regulation of postsynaptic cortactin distribution by BDNF and NMDA receptor activity. *Eur J Neurosci*, **22**, 2985-2994.
- Ishii, T., Haga, S. and Tokutake, S. (1978) Immunofluorescence studies on localization of actin-like protein in the mouse brain. *Acta Neuropathol*, **42**, 99-103.
- Ishikawa, R., Hayashi, K., Shirao, T., Xue, Y., Takagi, T., Sasaki, Y. and Kohama, K. (1994) Drebrin, a development-associated brain protein from rat embryo, causes the dissociation of tropomyosin from actin filaments. *J Biol Chem*, **269**, 29928-29933.
- Ishizuka, N., Weber, J. and Amaral, D.G. (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol*, **295**, 580-623.

- Jacob, T.C., Bogdanov, Y.D., Magnus, C., Saliba, R.S., Kittler, J.T., Haydon, P.G. and Moss, S.J. (2005) Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors. *J Neurosci*, **25**, 10469-10478.
- Janas, J., Skowronski, J. and Van Aelst, L. (2006) Lentiviral delivery of RNAi in hippocampal neurons. *Methods Enzymol*, **406**, 593-605.
- Janke, J., Schluter, K., Jandrig, B., Theile, M., Kolble, K., Arnold, W., Grinstein, E., Schwartz, A., Estevez-Schwarz, L., Schlag, P.M., Jockusch, B.M. and Scherneck, S. (2000) Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med*, **191**, 1675-1686.
- Jockusch, B.M., Murk, K. and Rothkegel, M. (2007) The profile of profilins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **159**, 131-149.
- Jockusch, B.M., Rothkegel, M. and Schwarz, G. (2004) Linking the synapse to the cytoskeleton: a breath-taking role for microfilaments. *Neuroreport*, **15**, 1535-1538.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F. and Holmes, K.C. (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature*, **347**, 37-44.
- Kaiser, D.A., Sato, M., Ebert, R.F. and Pollard, T.D. (1986) Purification and characterization of two isoforms of Acanthamoeba profilin. *J Cell Biol*, **102**, 221-226.
- Kaiser, D.A., Vinson, V.K., Murphy, D.B. and Pollard, T.D. (1999) Profilin is predominantly associated with monomeric actin in Acanthamoeba. *J Cell Sci*, **112** (Pt 21), 3779-3790.
- Kaksonen, M., Toret, C.P. and Drubin, D.G. (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 404-414.
- Karakesisoglou, I., Schleicher, M., Gibbon, B.C. and Staiger, C.J. (1996) Plant profilins rescue the aberrant phenotype of profilin-deficient Dictyostelium cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **34**, 36-47.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N. and Nakahara, H. (2003) Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*, **26**, 360-368.
- Kaufmann, W.E. and Moser, H.W. (2000) Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex*, **10**, 981-991.
- Kim, H.J., DiBernardo, A.B., Sloane, J.A., Rasband, M.N., Solomon, D., Kosaras, B., Kwak, S.P. and Vartanian, T.K. (2006) WAVE1 is required for oligodendrocyte morphogenesis and normal CNS myelination. *J Neurosci*, **26**, 5849-5859.
- Kirsch, J. and Betz, H. (1995) The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci*, **15**, 4148-4156.
- Kirsch, J., Langosch, D., Prior, P., Littauer, U.Z., Schmitt, B. and Betz, H. (1991) The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem*, **266**, 22242-22245.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H. and Bujard, H. (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10933-10938.
- Klein, M., Hempstead, B.L. and Teng, K.K. (2005) Activation of STAT5-dependent transcription by the neurotrophin receptor Trk. *J Neurobiol*, **63**, 159-171.
- Kneussel, M. and Loeblich, S. (2007) Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors. *Biol Cell*, **99**, 297-309.

- Knott, G.W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E. and Svoboda, K. (2006) Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci*, **9**, 1117-1124.
- Kopec, C.D., Li, B., Wei, W., Boehm, J. and Malinow, R. (2006) Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci*, **26**, 2000-2009.
- Korenbaum, E., Nordberg, P., Bjorkegren-Sjogren, C., Schutt, C.E., Lindberg, U. and Karlsson, R. (1998) The role of profilin in actin polymerization and nucleotide exchange. *Biochemistry*, **37**, 9274-9283.
- Kouyama, T. and Mihashi, K. (1981) Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur J Biochem*, **114**, 33-38.
- Kovar, D.R., Harris, E.S., Mahaffy, R., Higgs, H.N. and Pollard, T.D. (2006) Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell*, **124**, 423-435.
- Krebs, A., Rothkegel, M., Klar, M. and Jockusch, B.M. (2001) Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, **114**, 3663-3672.
- Krichevsky, A.M. and Kosik, K.S. (2002) RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11926-11929.
- Kruchten, A.E. and McNiven, M.A. (2006) Dynamin as a mover and pincher during cell migration and invasion. *J Cell Sci*, **119**, 1683-1690.
- Krucker, T., Siggins, G.R. and Halpain, S. (2000) Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6856-6861.
- Kuchler, S., Graff, M.N., Gobaille, S., Vincendon, G., Roche, A.C., Delaunoy, J.P., Monsigny, M. and Zanetta, J.P. (1994) Mannose dependent tightening of the rat ependymal cell barrier. In vivo and in vitro study using neoglycoproteins. *Neurochem Int*, **24**, 43-55.
- Kuhn, J.R. and Pollard, T.D. (2007) Single molecule kinetic analysis of actin filament capping. Polyphosphoinositides do not dissociate capping proteins. *J Biol Chem*, **282**, 28014-28024.
- Kursula, P., Kursula, I., Massimi, M., Song, Y.H., Downer, J., Stanley, W.A., Witke, W. and Wilmanns, M. (2008) High-resolution structural analysis of mammalian profilin 2a complex formation with two physiological ligands: the formin homology 1 domain of mDia1 and the proline-rich domain of VASP. *J Mol Biol*, **375**, 270-290.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lafuente, E.M., van Puijenbroek, A.A., Krause, M., Carman, C.V., Freeman, G.J., Berezovskaya, A., Constantine, E., Springer, T.A., Gertler, F.B. and Boussiotis, V.A. (2004) RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Dev Cell*, **7**, 585-595.
- Lalonde, S., Weise, A., Walsh, R.P., Ward, J.M. and Frommer, W.B. (2003) Fusion to GFP blocks intercellular trafficking of the sucrose transporter SUT1 leading to accumulation in companion cells. *BMC Plant Biol*, **3**, 8.
- Lambrechts, A., Jonckheere, V., Dewitte, D., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (2002) Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site. *BMC Biochem*, **3**, 12.

- Lambrechts, A., Jonckheere, V., Peleman, C., Polet, D., De Vos, W., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (2006) Profilin-I-ligand interactions influence various aspects of neuronal differentiation. *J Cell Sci*, **119**, 1570-1578.
- Lambrechts, A., Kwiatkowski, A.V., Lanier, L.M., Bear, J.E., Vandekerckhove, J., Ampe, C. and Gertler, F.B. (2000) cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. *J Biol Chem*, **275**, 36143-36151.
- Lambrechts, A., van Damme, J., Goethals, M., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (1995) Purification and characterization of bovine profilin II. Actin, poly(L-proline) and inositolphospholipid binding. *Eur J Biochem*, **230**, 281-286.
- Lambrechts, A., Verschelde, J.L., Jonckheere, V., Goethals, M., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (1997) The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences. *Embo J*, **16**, 484-494.
- Lamprecht, R., Farb, C.R., Rodrigues, S.M. and LeDoux, J.E. (2006) Fear conditioning drives profilin into amygdala dendritic spines. *Nat Neurosci*, **9**, 481-483.
- Lanzetti, L. (2007) Actin in membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 453-458.
- Lardi-Studler, B., Smolinsky, B., Petitjean, C.M., Koenig, F., Sidler, C., Meier, J.C., Fritschy, J.M. and Schwarz, G. (2007) Vertebrate-specific sequences in the gephyrin E-domain regulate cytosolic aggregation and postsynaptic clustering. *J Cell Sci*, **120**, 1371-1382.
- Lassing, I. and Lindberg, U. (1985) Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*, **314**, 472-474.
- Lederer, M., Jockusch, B.M. and Rothkegel, M. (2005) Profilin regulates the activity of p42POP, a novel Myb-related transcription factor. *J Cell Sci*, **118**, 331-341.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K. and Hempstead, B.L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, **294**, 1945-1948.
- Lewis, D.L., Hagstrom, J.E., Loomis, A.G., Wolff, J.A. and Herweijer, H. (2002) Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet*, **32**, 107-108.
- Li, X.G., Somogyi, P., Ylinen, A. and Buzsaki, G. (1994) The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol*, **339**, 181-208.
- Liang, X., Draghi, N.A. and Resh, M.D. (2004) Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *J Neurosci*, **24**, 7140-7149.
- Lin, B., Kramar, E.A., Bi, X., Brucher, F.A., Gall, C.M. and Lynch, G. (2005) Theta stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus. *J Neurosci*, **25**, 2062-2069.
- Lu, B., Pang, P.T. and Woo, N.H. (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 603-614.
- Lua, B.L. and Low, B.C. (2005) Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control. *FEBS Lett*, **579**, 577-585.
- Lyon, L., Kew, J.N., Corti, C., Harrison, P.J. and Burnet, P.W. (2008) Altered hippocampal expression of glutamate receptors and transporters in GRM2 and GRM3 knockout mice. *Synapse*, **62**, 842-850.
- Maas, C., Tagnaouti, N., Loebrich, S., Behrend, B., Lappe-Siefke, C. and Kneussel, M. (2006) Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J Cell Biol*, **172**, 441-451.

- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. and Pollard, T.D. (1994) Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*, **127**, 107-115.
- Mahoney, N.M., Janmey, P.A. and Almo, S.C. (1997) Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nat Struct Biol*, **4**, 953-960.
- Majoul, I., Shirao, T., Sekino, Y. and Duden, R. (2007) Many faces of drebrin: from building dendritic spines and stabilizing gap junctions to shaping neurite-like cell processes. *Histochem Cell Biol*, **127**, 355-361.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R. and Svoboda, K. (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*, **283**, 1923-1927.
- Mammoto, A., Sasaki, T., Asakura, T., Hotta, I., Imamura, H., Takahashi, K., Matsuura, Y., Shirao, T. and Takai, Y. (1998) Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun*, **243**, 86-89.
- Mayboroda, O., Schluter, K. and Jockusch, B.M. (1997) Differential colocalization of profilin with microfilaments in PtK2 cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **37**, 166-177.
- Meister, G. and Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, **431**, 343-349.
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., Lu, W.Y., MacDonald, J.F., Wang, J.Y., Falls, D.L. and Jia, Z. (2002) Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron*, **35**, 121-133.
- Michelot, A., Guerin, C., Huang, S., Ingouff, M., Richard, S., Rodiuc, N., Staiger, C.J. and Blanchoin, L. (2005) The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1. *Plant Cell*, **17**, 2296-2313.
- Miki, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J*, **17**, 6932-6941.
- Minehardt, T.J., Kollman, P.A., Cooke, R. and Pate, E. (2006) The open nucleotide pocket of the profilin/actin x-ray structure is unstable and closes in the absence of profilin. *Biophys J*, **90**, 2445-2449.
- Minichiello, L., Calella, A.M., Medina, D.L., Bonhoeffer, T., Klein, R. and Korte, M. (2002) Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, **36**, 121-137.
- Miyagi, Y., Yamashita, T., Fukaya, M., Sonoda, T., Okuno, T., Yamada, K., Watanabe, M., Nagashima, Y., Aoki, I., Okuda, K., Mishina, M. and Kawamoto, S. (2002) Delphilin: a novel PDZ and formin homology domain-containing protein that synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor delta 2 subunit. *J Neurosci*, **22**, 803-814.
- Mullins, R.D., Kelleher, J.F., Xu, J. and Pollard, T.D. (1998) Arp2/3 complex from *Acanthamoeba* binds profilin and cross-links actin filaments. *Mol Biol Cell*, **9**, 841-852.
- Nagaoka, R., Abe, H. and Obinata, T. (1996) Site-directed mutagenesis of the phosphorylation site of cofilin: its role in cofilin-actin interaction and cytoplasmic localization. *Cell Motil Cytoskeleton*, **35**, 200-209.
- Nedergaard, M., Ransom, B. and Goldman, S.A. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*, **26**, 523-530.

- Neuhoff, H., Sassoe-Pognetto, M., Panzanelli, P., Maas, C., Witke, W. and Kneussel, M. (2005) The actin-binding protein profilin I is localized at synaptic sites in an activity-regulated manner. *Eur J Neurosci*, **21**, 15-25.
- Nodelman, I.M., Bowman, G.D., Lindberg, U. and Schutt, C.E. (1999) X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins. *J Mol Biol*, **294**, 1271-1285.
- Obermann, H., Raabe, I., Balvers, M., Brunswig, B., Schulze, W. and Kirchhoff, C. (2005) Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation. *Mol Hum Reprod*, **11**, 53-64.
- Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A. and Hayashi, Y. (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci*, **7**, 1104-1112.
- Ortinski, P.I., Turner, J.R., Barberis, A., Motamedi, G., Yasuda, R.P., Wolfe, B.B., Kellar, K.J. and Vicini, S. (2006) Deletion of the GABA(A) receptor alpha1 subunit increases tonic GABA(A) receptor current: a role for GABA uptake transporters. *J Neurosci*, **26**, 9323-9331.
- Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M. and Rosen, M.K. (2005) Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature*, **433**, 488-494.
- Pak, C.W., Flynn, K.C. and Bamberg, J.R. (2008) Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 136-147.
- Park, E., Na, M., Choi, J., Kim, S., Lee, J.R., Yoon, J., Park, D., Sheng, M. and Kim, E. (2003) The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem*, **278**, 19220-19229.
- Paul, A.S. and Pollard, T.D. (2008) The role of the FH1 domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation. *Curr Biol*, **18**, 9-19.
- Pedraza, L., Huang, J.K. and Colman, D.R. (2001) Organizing principles of the axoglial apparatus. *Neuron*, **30**, 335-344.
- Perelroizen, I., Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (1995) Binding of divalent cation and nucleotide to G-actin in the presence of profilin. *J Biol Chem*, **270**, 1501-1508.
- Pilo-Boyl, P., Di Nardo, A., Mülle, C., Sassoe-Pognetto, M., Panzanelli, P., Mele, A., Kneussel, M., Costantini, V., Perlas, E., Massimi, M., Vara, H., Giustetto, M. and Witke, W. (2007) Profilin2 contributes to synaptic vesicle exocytosis, neuronal excitability, and novelty-seeking behavior. *Embo J*, **26**, 2991-3002.
- Polet, D., Lambrechts, A., Vandepoele, K., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (2007) On the origin and evolution of vertebrate and viral profilins. *FEBS Lett*, **581**, 211-217.
- Pollard, T.D. and Quirk, S. (1994) Profilins, ancient actin binding proteins with highly divergent primary structures. *Soc Gen Physiol Ser*, **49**, 117-128.
- Pollard, T.D. (1986) Assembly and dynamics of the actin filament system in nonmuscle cells. *J Cell Biochem*, **31**, 87-95.
- Qian, C., Zhang, Q., Wang, X., Zeng, L., Farooq, A. and Zhou, M.M. (2005) Structure of the adaptor protein p14 reveals a profilin-like fold with distinct function. *J Mol Biol*, **347**, 309-321.

- Qualmann, B., Kessels, M.M. and Kelly, R.B. (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **150**, F111-116.
- Radauer, C. and Breiteneder, H. (2007) Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **120**, 518-525.
- Rawe, V.Y., Payne, C. and Schatten, G. (2006) Profilin and actin-related proteins regulate microfilament dynamics during early mammalian embryogenesis. *Hum Reprod*, **21**, 1143-1153.
- Raymond, G.V., Bauman, M.L. and Kemper, T.L. (1996) Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathol*, **91**, 117-119.
- Reichardt, L.F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **361**, 1545-1564.
- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B.M. and Walter, U. (1995) The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J*, **14**, 1583-1589.
- Rex, C.S., Lin, C.Y., Kramar, E.A., Chen, L.Y., Gall, C.M. and Lynch, G. (2007) Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J Neurosci*, **27**, 3017-3029.
- Romero, S., Didry, D., Larquet, E., Boisset, N., Pantaloni, D. and Carlier, M.F. (2007) How ATP hydrolysis controls filament assembly from profilin-actin: implication for formin processivity. *J Biol Chem*, **282**, 8435-8445.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D. and Carlier, M.F. (2004) Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*, **119**, 419-429.
- Rosan, S (2007). Charakterisierung der Liganden-Bindungsfunktion für das Tumorsuppressor-Protein Profilin 1. Dissertation, TU Braunschweig.
- Rosch, H., Schweigreiter, R., Bonhoeffer, T., Barde, Y.A. and Korte, M. (2005) The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7362-7367.
- Rostaing, P., Real, E., Siksou, L., Lechaire, J.P., Boudier, T., Boeckers, T.M., Gertler, F., Gundelfinger, E.D., Triller, A. and Marty, S. (2006) Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography. *Eur J Neurosci*, **24**, 3463-3474.
- Rothkegel, M., Mayboroda, O., Rohde, M., Wucherpennig, C., Valenta, R. and Jockusch, B.M. (1996) Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells. *J Cell Sci*, **109** (Pt 1), 83-90.
- Rudiger, M., Jockusch, B.M. and Rothkegel, M. (1997) Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques*, **23**, 96-97.
- Saha, R.N. and Dudek, S.M. (2008) Action potentials: to the nucleus and beyond. *Exp Biol Med (Maywood)*, **233**, 385-393.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sasaki, Y., Hayashi, K., Shirao, T., Ishikawa, R. and Kohama, K. (1996) Inhibition by drebrin of the actin-bundling activity of brain fascin, a protein localized in filopodia of growth cones. *J Neurochem*, **66**, 980-988.

- Sathish, K., Padma, B., Munugalavadla, V., Bhargavi, V., Radhika, K.V., Wasia, R., Sairam, M. and Singh, S.S. (2004) Phosphorylation of profilin regulates its interaction with actin and poly (L-proline). *Cell Signal*, **16**, 589-596.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. and Gey, G.O. (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*, **97**, 695-710.
- Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M. and Faix, J. (2005) The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol*, **7**, 619-625.
- Schleicher, M. and Jockusch, B.M. (2008) Actin: its cumbersome pilgrimage through cellular compartments. *Histochem Cell Biol*, **129**, 695-704.
- Schluter, K., Schleicher, M. and Jockusch, B.M. (1998) Effects of single amino acid substitutions in the actin-binding site on the biological activity of bovine profilin I. *J Cell Sci*, **111** (Pt 22), 3261-3273.
- Schlüter, K. (1996). Struktur-Funktions-Beziehungen beim Cytoskelettprotein Profilin: Modulation der Aktin- Bindungseigenschaften. Dissertation, TU-Braunschweig.
- Schmandke, A. and Strittmatter, S.M. (2007) ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *Neuroscientist*, **13**, 454-469.
- Schnitzer, J., Franke, W.W. and Schachner, M. (1981) Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol*, **90**, 435-447.
- Schoenenberger, C.A., Buchmeier, S., Boerries, M., Sutterlin, R., Aebi, U. and Jockusch, B.M. (2005) Conformation-specific antibodies reveal distinct actin structures in the nucleus and the cytoplasm. *J Struct Biol*, **152**, 157-168.
- Schroeder, U., Graff, A., Buchmeier, S., Rigler, P., Tropel, D. Jockusch, B.M., Aebi, U. Burkhard, P. and Schoenenberger, C.A. (2008) Peptide nanoparticles serve as a powerful platform for the immunogenic display of poorly antigenic actin determinants. Manuscript submitted
- Schubert, V., Da Silva, J.S. and Dotti, C.G. (2006) Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *J Cell Biol*, **172**, 453-467.
- Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C. and Lindberg, U. (1993) The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature*, **365**, 810-816.
- Selden, L.A., Kinosian, H.J., Estes, J.E. and Gershman, L.C. (1999) Impact of profilin on actin-bound nucleotide exchange and actin polymerization dynamics. *Biochemistry*, **38**, 2769-2778.
- Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D.H. and Hirokawa, N. (2000) Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science*, **288**, 1796-1802.
- Severson, A.F., Baillie, D.L. and Bowerman, B. (2002) A Formin Homology protein and a profilin are required for cytokinesis and Arp2/3-independent assembly of cortical microfilaments in *C. elegans*. *Curr Biol*, **12**, 2066-2075.
- Shao, J., Welch, W.J., Diprospero, N.A. and Diamond, M.I. (2008) Phosphorylation of profilin by ROCK1 regulates polyglutamine aggregation. *Mol Cell Biol*, **28**, 5196-5208.

- Sharma, A., Lambrechts, A., Hao le, T., Le, T.T., Sewry, C.A., Ampe, C., Burghes, A.H. and Morris, G.E. (2005) A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp Cell Res*, **309**, 185-197.
- Sholl, D.A. (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, **87**, 387-406.
- Siksou, L., Rostaing, P., Lechaire, J.P., Boudier, T., Ohtsuka, T., Fejtova, A., Kao, H.T., Greengard, P., Gundelfinger, E.D., Triller, A. and Marty, S. (2007) Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *J Neurosci*, **27**, 6868-6877.
- Silva, J.M., Li, M.Z., Chang, K., Ge, W., Golding, M.C., Rickles, R.J., Siolas, D., Hu, G., Paddison, P.J., Schlabach, M.R., Sheth, N., Bradshaw, J., Burchard, J., Kulkarni, A., Cavet, G., Sachidanandam, R., McCombie, W.R., Cleary, M.A., Elledge, S.J. and Hannon, G.J. (2005) Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet*, **37**, 1281-1288.
- Simmen, K.A., Waldschmidt, R., Bernues, J., Parry, H.D., Seifart, K.H. and Mattaj, I.W. (1992) Proximal sequence element factor binding and species specificity in vertebrate U6 snRNA promoters. *J Mol Biol*, **223**, 873-884.
- Skaper, S.D. (2008) The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **7**, 46-62.
- Skare, P. and Karlsson, R. (2002) Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Lett*, **522**, 119-124.
- Skare, P., Kreivi, J.P., Bergstrom, A. and Karlsson, R. (2003) Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res*, **286**, 12-21.
- Sloane, J.A. and Vartanian, T.K. (2007) WAVE1 and regulation of actin nucleation in myelination. *Neuroscientist*, **13**, 486-491.
- Soderling, S.H., Langeberg, L.K., Soderling, J.A., Davee, S.M., Simerly, R., Raber, J. and Scott, J.D. (2003) Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1723-1728.
- Sohn, R.H., Chen, J., Koblan, K.S., Bray, P.F. and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1995) Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin. *J Biol Chem*, **270**, 21114-21120.
- Sola, M., Bavro, V.N., Timmins, J., Franz, T., Ricard-Blum, S., Schoehn, G., Ruigrok, R.W., Paarmann, I., Saiyed, T., O'Sullivan, G.A., Schmitt, B., Betz, H. and Weissenhorn, W. (2004) Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *Embo J*, **23**, 2510-2519.
- Sorensen, S.A. and Rubel, E.W. (2006) The level and integrity of synaptic input regulates dendrite structure. *J Neurosci*, **26**, 1539-1550.
- Southwick, F.S. and Young, C.L. (1990) The actin released from profilin--actin complexes is insufficient to account for the increase in F-actin in chemoattractant-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol*, **110**, 1965-1973.
- Spruston, N. (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 206-221.
- Stallmeyer, B., Schwarz, G., Schulze, J., Nerlich, A., Reiss, J., Kirsch, J. and Mendel, R.R. (1999) The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1333-1338.

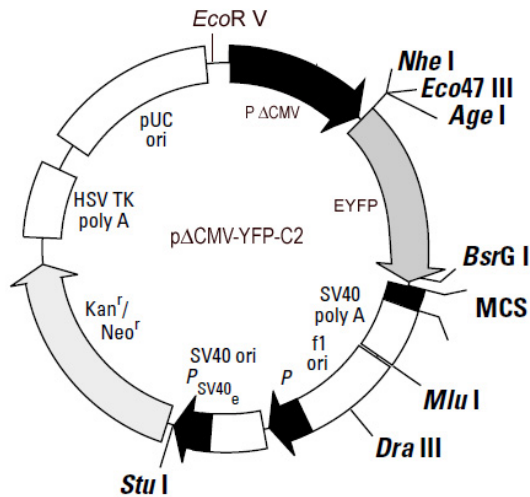
- Star, E.N., Kwiatkowski, D.J. and Murthy, V.N. (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci*, **5**, 239-246.
- Steiner, J., Bernstein, H.G., Bielau, H., Berndt, A., Brisch, R., Mawrin, C., Keilhoff, G. and Bogerts, B. (2007) Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci*, **8**, 2.
- Stuven, T., Hartmann, E. and Gorlich, D. (2003) Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *Embo J*, **22**, 5928-5940.
- Sudhof, T.C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 509-547.
- Suetsugu, S., Miki, H. and Takenawa, T. (1998) The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *Embo J*, **17**, 6516-6526.
- Syken, J., De-Medina, T. and Munger, K. (1999) TID1, a human homolog of the Drosophila tumor suppressor l(2)tid, encodes two mitochondrial modulators of apoptosis with opposing functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8499-8504.
- Takahashi, H., Sekino, Y., Tanaka, S., Mizui, T., Kishi, S. and Shirao, T. (2003) Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci*, **23**, 6586-6595.
- Takao-Rikitsu, E., Mochida, S., Inoue, E., Deguchi-Tawarada, M., Inoue, M., Ohtsuka, T. and Takai, Y. (2004) Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release. *J Cell Biol*, **164**, 301-311.
- Takenawa, T. and Miki, H. (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci*, **114**, 1801-1809.
- Tanaka, M. and Shibata, H. (1985) Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur J Biochem*, **151**, 291-297.
- Theriot, J.A., Rosenblatt, J., Portnoy, D.A., Goldschmidt-Clermont, P.J. and Mitchison, T.J. (1994) Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell*, **76**, 505-517.
- Thompson, K.R., Otis, K.O., Chen, D.Y., Zhao, Y., O'Dell, T.J. and Martin, K.C. (2004) Synapse to nucleus signaling during long-term synaptic plasticity; a role for the classical active nuclear import pathway. *Neuron*, **44**, 997-1009.
- Tochio, H., Tsui, M.M., Banfield, D.K. and Zhang, M. (2001) An autoinhibitory mechanism for nonsyntaxin SNARE proteins revealed by the structure of Ykt6p. *Science*, **293**, 698-702.
- Toledo-Aral, J.J., Brehm, P., Halegoua, S. and Mandel, G. (1995) A single pulse of nerve growth factor triggers long-term neuronal excitability through sodium channel gene induction. *Neuron*, **14**, 607-611.
- tom Dieck, S., Sanmarti-Vila, L., Langnaese, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K.H., Kampf, U., Franzer, J.T., Stumm, M., Garner, C.C. and Gundelfinger, E.D. (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol*, **142**, 499-509.
- Tsakraklides, V., Krogh, K., Wang, L., Bizario, J.C., Larson, R.E., Espreafico, E.M. and Wolenski, J.S. (1999) Subcellular localization of GFP-myosin-V in live mouse melanocytes. *J Cell Sci*, **112** (Pt 17), 2853-2865.

- Vartanian, T., Goodearl, A., Viehover, A. and Fischbach, G. (1997) Axonal neuregulin signals cells of the oligodendrocyte lineage through activation of HER4 and Schwann cells through HER2 and HER3. *J Cell Biol*, **137**, 211-220.
- Ventura, R. and Harris, K.M. (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci*, **19**, 6897-6906.
- Verhey, K.J., Meyer, D., Deehan, R., Blenis, J., Schnapp, B.J., Rapoport, T.A. and Margolis, B. (2001) Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol*, **152**, 959-970.
- Verheyen, E.M. and Cooley, L. (1994) Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development*, **120**, 717-728.
- Walders-Harbeck, B., Khaitlina, S.Y., Hinssen, H., Jockusch, B.M. and Illenberger, S. (2002) The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett*, **529**, 275-280.
- Wang, X., Kibschull, M., Laue, M.M., Lichte, B., Petrasch-Parwez, E. and Kilimann, M.W. (1999) Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin. *J Cell Biol*, **147**, 151-162.
- Watanabe, M., Nomura, K., Ohyama, A., Ishikawa, R., Komiya, Y., Hosaka, K., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Sasakawa, N., Kumakura, K., Ushiki, T., Sato, O., Ikebe, M. and Igarashi, M. (2005) Myosin-Va regulates exocytosis through the submicromolar Ca²⁺-dependent binding of syntaxin-1A. *Mol Biol Cell*, **16**, 4519-4530.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M. and Narumiya, S. (1997) p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J*, **16**, 3044-3056.
- Wegner, A.M., Nebhan, C.A., Hu, L., Majumdar, D., Meier, K.M., Weaver, A.M. and Webb, D.J. (2008) N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem*, **283**, 15912-15920.
- Witke, W. (2004) The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol*, **14**, 461-469.
- Witke, W., Podtelejnikov, A.V., Di Nardo, A., Sutherland, J.D., Gurniak, C.B., Dotti, C. and Mann, M. (1998) In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *Embo J*, **17**, 967-976.
- Witke, W., Sutherland, J.D., Sharpe, A., Arai, M. and Kwiatkowski, D.J. (2001) Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3832-3836.
- Wittenmayer, N., Jandrig, B., Rothkegel, M., Schluter, K., Arnold, W., Haensch, W., Scherneck, S. and Jockusch, B.M. (2004) Tumor suppressor activity of profilin requires a functional actin binding site. *Mol Biol Cell*, **15**, 1600-1608.
- Wittenmayer, N., Rothkegel, M., Jockusch, B.M. and Schluter, K. (2000) Functional characterization of green fluorescent protein-profilin fusion proteins. *Eur J Biochem*, **267**, 5247-5256.
- Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L. and Lu, B. (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*, **8**, 1069-1077.

- Worthington, W.C., Jr. and Cathcart, R.S., 3rd. (1966) Ciliary currents on ependymal surfaces. *Ann N Y Acad Sci*, **130**, 944-950.
- Yamashita, T., Higuchi, H. and Tohyama, M. (2002) The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol*, **157**, 565-570.
- Yamashita, T. and Tohyama, M. (2003) The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci*, **6**, 461-467.
- Yamashita, T., Tucker, K.L. and Barde, Y.A. (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron*, **24**, 585-593.
- Yang, C., Huang, M., DeBiasio, J., Pring, M., Joyce, M., Miki, H., Takenawa, T. and Zigmond, S.H. (2000) Profilin enhances Cdc42-induced nucleation of actin polymerization. *J Cell Biol*, **150**, 1001-1012.
- Yarmola, E.G. and Bubb, M.R. (2004) Effects of profilin and thymosin beta4 on the critical concentration of actin demonstrated in vitro and in cell extracts with a novel direct assay. *J Biol Chem*, **279**, 33519-33527.
- Yuste, R. and Bonhoeffer, T. (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 24-34.
- Zagrebelsky, M., Holz, A., Dechant, G., Barde, Y.A., Bonhoeffer, T. and Korte, M. (2005) The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J Neurosci*, **25**, 9989-9999.
- Zhang, W. and Benson, D.L. (2002) Developmentally regulated changes in cellular compartmentation and synaptic distribution of actin in hippocampal neurons. *J Neurosci Res*, **69**, 427-436.
- Zhao, W.M., Jiang, C., Kroll, T.T. and Huber, P.W. (2001) A proline-rich protein binds to the localization element of *Xenopus* Vg1 mRNA and to ligands involved in actin polymerization. *Embo J*, **20**, 2315-2325.
- Zhou, F.Q. and Cohan, C.S. (2001) Growth cone collapse through coincident loss of actin bundles and leading edge actin without actin depolymerization. *J Cell Biol*, **153**, 1071-1084.
- Zhou, Q., Homma, K.J. and Poo, M.M. (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, **44**, 749-757.
- Zhou, Q., Wang, S. and Anderson, D.J. (2000) Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron*, **25**, 331-343.
- Zieseniss, A., Schroeder, U., Buchmeier, S., Schoenenberger, C.A., van den Heuvel, J., Jockusch, B.M. and Illenberger, S. (2007) Raver1 is an integral component of muscle contractile elements. *Cell Tissue Res*, **327**, 583-594.
- Zirrgiebel, U., Ohga, Y., Carter, B., Berninger, B., Inagaki, N., Thoenen, H. and Lindholm, D. (1995) Characterization of TrkB receptor-mediated signaling pathways in rat cerebellar granule neurons: involvement of protein kinase C in neuronal survival. *J Neurochem*, **65**, 2241-2250.
- Zou, L., Jaramillo, M., Whaley, D., Wells, A., Panchapakesa, V., Das, T. and Roy, P. (2007) Profilin-1 is a negative regulator of mammary carcinoma aggressiveness. *Br J Cancer*, **97**, 1361-1371.

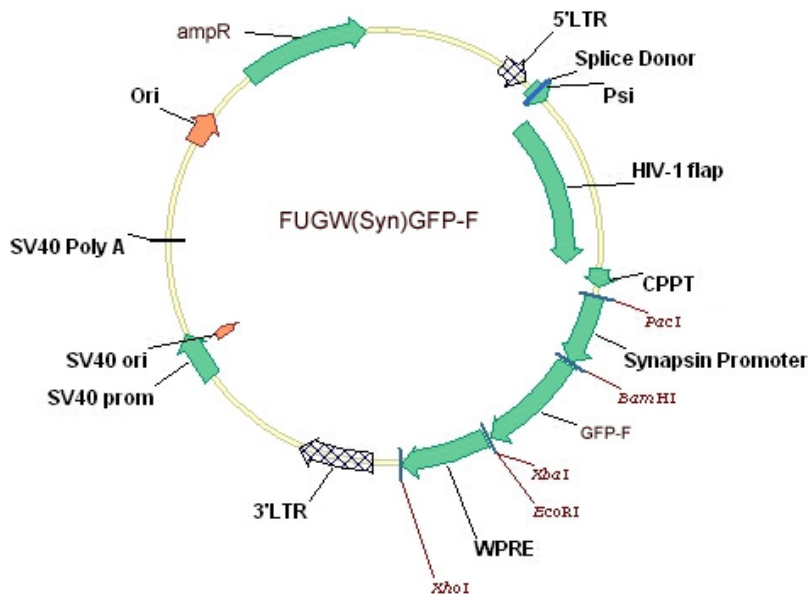
6 Anhang

pΔCMV-YFP-C2



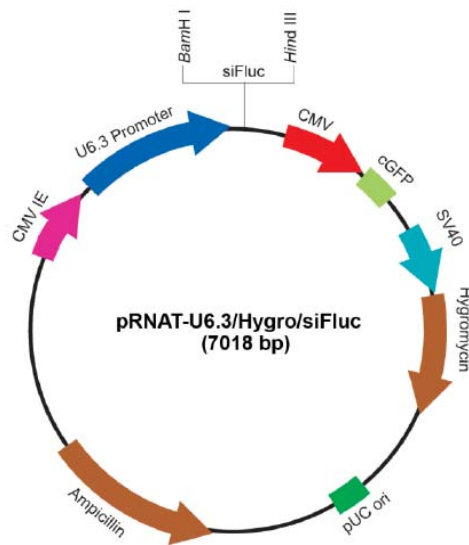
pΔCMV-YFP-C2 basiert auf pEGFP-C2 (Clontech). Die EGFP-cDNA wurde durch die Restriktion mit AgeI / BsrGI gegen die EYFP-cDNA des pEYFP-C1 (Clontech) substituiert. Drei der vier Enhancer-Kassetten des CMV-Promotors wurden per AseI / SnaBI-Restriktionsverdau deletiert. Vor dem CMV-Promotor wurde eine EcoRV-Schnittstelle eingefügt.

FUGW(Syn)GFP-F



Dieser lentivirale Expressionsvektor wurde von Nina Wittenmayer (Universität Heidelberg) zur Transfektion hippocampaler Neurone generiert.

pRNAT U6.3/Hygro/siFluc



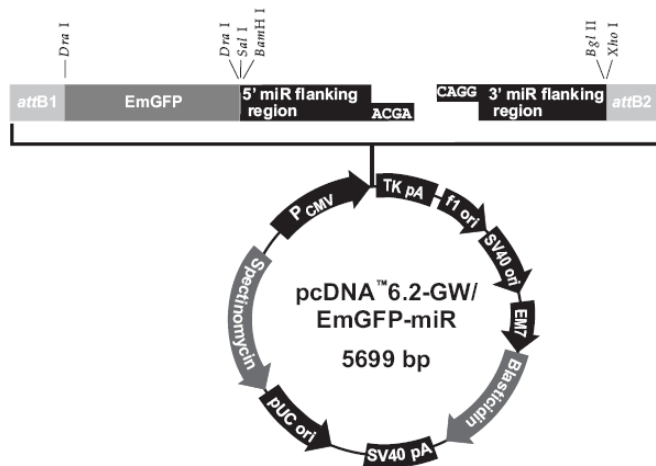
Polylinker: 824-893
 CMV IE: 7-490
 siFluc: 830-887
 U6 Promoter: 497-823
 CMV Promoter: 932-1519
 cGFP: 1536-2255
 SV40 Promoter: 2944-3289
 Hygromycin: 3312-4337
 pUC ori: 5007-5647
 Ampicillin: 5795-6655

Forward Sequencing Primer:
[DA0011: pRNA-U6 Forward](#)
 (TACGATACAAGGCTGTTAGAGAG)
 Reverse Sequencing Primer:
[DA0012: pRNA Reverse](#)
 (TAGAAGGCACAGTCGAGG)

Der Vektor pRNAT-U6.3/Hygro/siFluc wurde an Position 936 mit einer zusätzlichen EcoRV-Schnittstelle versehen. An Position 2294 wurde eine zusätzliche ApaI-Schnittstelle eingefügt.

Quelle: Genscript

pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR



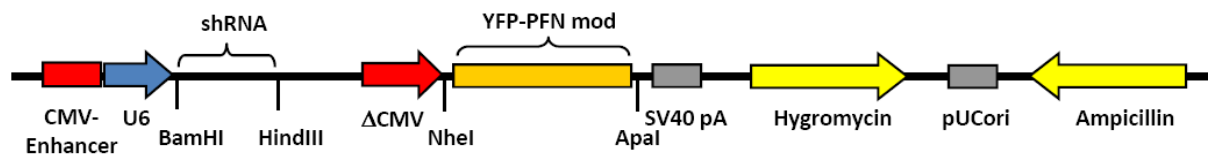
Quelle: Invitrogen

Der Leervektor wurde zur Zirkularisierung mit folgender Linker-Sequenz versehen.

BsmBI *EcoRI* *BsaI*
 5`-TGCTGGAGACGGAATTTCGGTCTCG-3`
 3`-CCTCTGCCTTAAGCCAGAGCGTCC-5`

miRNA-spezifische Oligonukleotide wurden mittels BsmBI /BsaI-Restriktionsverdau in den Vektor pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR kloniert.

Profilin spezifische „Knock down & Knock in“-Vektor



Für YFP-Profilin codierende cDNAs wurden samt ΔCMV-Promotor per EcoRV / ApaI-Restriktionsverdau aus pΔCMV-YFP-PFN-Vektoren in den modifizierten pRNAT 2.13-Vektor inseriert.

Internetadressen zur *in silico*-Vorhersage funktioneller RNAi-Sequenzen

Genscript:

<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>

Sigma-Aldrich:

http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Functional_Genomics_and_RNAi.html

Invitrogen:

<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>

PCR-Programm für die ortsspezifische Mutagenese

1. 30 sec 95°C
2. 30 sec 95°C
3. 1 min 55°C (an Primer adaptiert)
4. 13 min 68°C (die Elongationszeit wird gemäß der Konstruktgröße adaptiert)

Die Schritte 2.-4. werden in 19 Zyklen wiederholt.

5. auf 4°C kühlen

Programm zum Annealing von Oligonukleotiden

1. 2 min 88°C
2. 5 min 65°C
3. 5 min 55°C
4. 5 min 37°C
5. 5 min 22°C

Nukleotid-Sequenz der synthetischen Profilin 1-Sequenz

```

atggctggctggaacgcttacatcgatagccttatggcgcacggcacgtgtcaggaagcgcgtatcgtgggtac
atggcgggtggaacgcttacatcgacaacctcatggcggacgggacgtgtcaggaagcggcgtatcgtgggtac

aaagattcgccatccgtgtgggtgctgtccccggcaagacgtttgtcaaatcacccagcgcaggtgggtgctc
aaggactcgccatccgtgtgggtgctgtccccgggaaacgttctgcaaatcacgccagctgaggtgggtgctc

ctcgttgggaaggaccgttcaagttttacgtgaacggcctcacactggggggcagaaatgttccgtgatccgt
ctggttggcaaagaccgtgtcaagttttacgtgaatgggtgacacttggggggcagaaatgttccgtgatccgt

gactcactcctccaggtggcgaagttttccatggacgtgacgaccaaagagtaccggcggtgtccaaacctttaac
gactcactgctgcaggtgggaatttagcatggatcttcgtaccaagagcaccggtgggggccccacctttaac

gtgactgtgacgaaactgacaaacgctggtccttcttatggggaaaggaaggcgtccacggcggtctgatcaat
gtcactgtcaccaagactgacaaagcgtagtccgtgctgatgggcaagaagggtgtccacggcggtttgatcaac

aaaaagtgttacgaaatggcttccacactgcgtcgcttcgcagtattga      hPFN1 WT-cDNA
aagaaatgttatgaaatggcttccacacttcggcgcttcgcagtactga      modifizierte hPFN1-cDNA

```

Stille Mutationen zwischen natürlicher und synthetischer hPFN1-cDNA sind in rot hervorgehoben.

Quelle: Rosan, 2007

Nukleotidsequenz der synthetischen Profilin 2a-cDNA

non-optimized	GAATTCGCCACCATGGCCGGTTGGCAGAGCTACGTGGATAACCTGATGTGCGATGGCTGC	60
optimized	GAATTCGCCACCATGGCTGGCTGGAAACGCCTACATCGACAACCTGATGGCCGACGGCACC	60
	***** *	
non-optimized	TGCCAGGAGGCCGCCATTGTTCGGCTACTGCGACGCCAAATACGTCTGGGCAGCCACGGCC	120
optimized	TGTCAGGAGGCTGTATTGTGGGATACTGCGACGCCAAGTATGTGTGGGCGGCCACGGCT	120
	* *	
non-optimized	GGGGGCGTCTTCCAGAGCATCACGCCAGTAGAAATAGATATGATTGTAGAAAAGACCGG	180
optimized	GGCGGCGTGTTCAGTCTATACCCCCGTGGAGATCGACATGATTGTGGCAAGGACAGG	180
	* *	
non-optimized	GAAGGTTTCTTTACCAACGGTTTGACTCTTGGAGCAAAGAAGTGTCTGTGATCAGAGAT	240
optimized	GAGGGCTTCTTCACCAACGGCTGACCTGGGCGCCAAGAAGTGCAGCTGATCAGGGAC	240
	* *	
non-optimized	AGCCTATACGTTGATGGTGACTGCACAATGGACATCCGGACAAAGAGTCAAGGTGGGGAG	300
optimized	AGCCTGTACGTGGACGGCGACTGTACAATGGACATCAGAACCAAGAGCCAGGGCGCGAG	300
	* *	
non-optimized	CCAACATACAACGTTGCTGTTGGCAGGGCCGGAGAGTCTTGGTCTTTGTAATGGGAAAA	360
optimized	CCTACCTACAATGTGGCTGTGGGCAGAGCCGGCAGAGTGTCTGGTGTTCGTGATGGGCAAG	360
	* *	
non-optimized	GAAGGGGTCCATGGAGGCGGATTGAATAAGAAGGCATACTCAATGGCAAAATACTTGAGA	420
optimized	GAGGGCGTGACGGCGGAGGACTGAACAAGAAAGCCTACAGCATGGCCAGTACCTGAGG	420
	* *	
non-optimized	GACTCTGGGTTCTAGCTCGAG	441
optimized	GACAGCGGCTTCTGACTCGAG	441
	* *	

Die als „non-optimized“ bezeichnete Sequenz stellt die natürliche mPFN2a-cDNA dar. Als „optimized“ wurde die synthetische cDNA bezeichnet. Zwischen den Sequenzen übereinstimmende Nukleotide sind mit einem Stern markiert.

Quelle: Geneart

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Frau Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch möchte ich mich für die jahrelange Unterstützung und Betreuung während meines Studiums, meiner Diplom-Arbeit und meiner Promotion am Zoologischen Institut bedanken.

Herrn Prof. Dr. Martin Korte danke ich für die Übernahme des Co-Referats sowie die umfassende Unterstützung in der Anfertigung meiner Doktorarbeit. Durch die Kooperation mit Prof. Dr. Martin Kortes Arbeitsgruppe wurde mir der Einstieg in die Neurobiologie ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und die exzellente Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Martin Rothkegel bedanken, auf dessen DFG-Projekt ich meine Doktorarbeit anfertigen konnte. Durch seine Expertise konnte ich meine Vorhaben im Labor erfolgreich umsetzen. Außerdem stand er mir bei Problemen verschiedenster Art mit Rat und Tat beiseite.

Kristin Michaelsen danke ich besonders für ihre großen Bemühungen bei der Kultivierung, Transfektion und den morphologischen Analysen der Neurone.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Nina Wittenmayer (Universität Heidelberg) für all die Mühe mit den lentiviralen Transfektionen der hippocampalen Neurone, dem regen wissenschaftlichen Austausch und der Möglichkeit, im schönen Heidelberg selbst zu experimentieren.

PD Dr. Robert Hänsch danke ich für die intensive Hilfe mit dem konfokalen LSM.

Der „Bittner-Group“ danke ich (insbesondere Julia, Nicole, Bettina und Marjam) für die regen Diskussionen sowie die regelmäßige Versorgung mit Zucker-angereicherten Nahrungsmitteln und Coffein-haltigen Erfrischungsgetränken

Sabine Buchmeier gilt mein besonderer Dank für die Mühe mit der Herstellung einzigartiger Profilinspezifischer Antikörper, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei Tina Geisler, Tania Messerschmidt, Jasmin Will und Carmen Wucherpennig möchte ich für die großartige Unterstützung bei den Experimenten und den schönen Stunden im Labor bedanken.

Bei meinen Mit-Doktoranden Maren Siemon, Guido Herzberg und Sascha Swiniarski sowie Dr. Berenike Henneberg und Manou Fabienke möchte ich mich für das unglaublich tolle Arbeitsklima, die Hilfestellungen bei Problemen verschiedenster Natur und die beste Zusammenarbeit, die man sich wünschen kann, bedanken. Natürlich nicht zu vergessen, all die nicht-wissenschaftlichen Aktivitäten, die mir stets viel Freude und gute Laune bereitet haben.

Einen sehr großen Anteil an dieser Arbeit haben meine Freunde Andreas, Matthias, Julia, Anne und Corinna, die mir während der Doktorarbeit zur Seite standen und meine Freizeit bereicherten. Andreas danke ich besonders für das akkurate Korrektur-Lesen meiner Arbeit sowie das „Unsicher machen“ Braunschweiger Lokalitäten und Diskotheken.

Bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, bedanke ich mich nicht nur für die jahrelange finanzielle Unterstützung, sondern vor allem für den bedingungslosen Rückhalt und das Ertragen meiner schlechten Laborlaune an den vielen Wochenenden.